

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIA  
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARASITOS ENTÉRICOS DE IMPORTÂNCIA  
EM SAÚDE ÚNICA EM PROPRIEDADES RURAIS ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR EM FEZES E ÁGUA DE CONSUMO**

**AMANDA VIEIRA DA SILVA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ**

**2024**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARASITOS ENTÉRICOS DE IMPORTÂNCIA  
EM SAÚDE ÚNICA EM PROPRIEDADES RURAIS ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR EM FEZES E ÁGUA DE CONSUMO**

**AMANDA VIEIRA DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Concentração em Sanidade Animal.

**ORIENTADOR: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira**

**COORIENTADORA: Samira Salim Mello Gallo**

**Campos dos Goytacazes**

**2024**

**AMANDA VIEIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARASITOS ENTÉRICOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ÚNICA EM PROPRIEDADES RURAIS ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM FEZES E ÁGUA DE CONSUMO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Concentração em Sanidade Animal.

Aprovado em 06 de março de 2024

**BANCA EXAMINADORA**

  
Pesquisador Edwards  
Documento assinado digitalmente  
gov.br NICOLE BRAND EDERLI  
Data: 09/07/2024 16:54:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Nicole Brand Ederli - UFPA

  
Profª. Samira Salim Mello Gallo - UENF  
(Coorientadora)

  
Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira - UENF  
(Orientador)

“Seja forte e corajoso!  
Não se apavore nem desanime,  
pois o Senhor, o seu Deus, estará  
com você por onde você andar”

**Josué 1:9**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, porém, nem todas as preces de agradecimento são capazes de expressar a minha total gratidão, sem Ele nada somos e nada fazemos. Agradeço a Nossa Senhora, que nunca deixou de interceder por mim principalmente nos momentos mais difíceis.

A minha família, em especial meu pai Antônio José (*in memorian*), que infelizmente não pode compartilhar comigo esse momento em vida, mas, que além de todo amor, me deixou a maior herança, a educação. A minha mãe Solange Vieira, motivo das minhas lutas e conquistas, a quem devo tudo.

Aos meus irmãos, Ricardo Vieira e Rafaela Vieira e, meu cônjuge, Wander Medeiros, obrigada por tudo, vocês são meu alicerce.

Aos meus colegas de trabalho, que tornaram os dias mais leves, inclusive minha amiga Taynara Elizeu, que esteve comigo no dia-a-dia e em todas as etapas da pesquisa.

A minha orientadora da graduação Lílian Tostes (*in memorian*), pela contribuição pessoal e profissional, serei eternamente grata por tanto.

Ao meu orientador Francisco Carlos de Oliveira, pelo acolhimento, paciência, por me conceder essa oportunidade e acreditar que esse projeto daria certo.

A minha coorientadora Dra. Samira Salim, pelo profissionalismo e contribuição na condução da pesquisa mediante as práticas laboratoriais.

Aos proprietários que me receberam em suas propriedades e residência, além de ceder seus animais, permitindo o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante todo o mestrado.

A todos aqueles que contribuíram forma direta ou indiretamente para minha formação, pois, ninguém chega a lugar algum sozinho.

Obrigada a todos que torceram por mim, por me citar em suas orações e acreditar que eu seria capaz!

## RESUMO

SILVA, A.V. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2024. Avaliação da infecção por protozoários entéricos de importância em saúde única em propriedades rurais através do diagnóstico molecular em fezes e água de consumo. Coorientadora: Dra Samira Salim Mello Gallo. Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Os parasitos e as doenças parasitárias são de suma importância para Saúde Única, estando a transmissão relacionada a fatores socioambientais e alterações do ecossistema. O presente estudo objetivou identificar protozoários, como *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Enterocytozoon* sp., *Balantioides* spp., *Entamoeba* spp. e *Blastocystis* sp. em bovinos, suínos, ovinos, caprinos e em fontes de água de consumo animal e residentes de propriedades rurais da região da Zona da Mata Mineira, divisa com o Estado do Rio de Janeiro. Para tanto, foram coletadas por conveniência 288 amostras de fezes, 100 de bovinos, 74 de ovinos, 63 de suínos e 51 de caprinos, além de 10 litros de água utilizadas para consumo. Para concentração dos protozoários nas fezes foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação com solução hiper saturada de sacarose (1,1g/mL). As amostras de água foram pré-filtradas com papel de filtro qualitativo seguido de nova filtração com filtro de fibra de vidro com auxílio de dispositivo à vácuo para retenção de cistos e oocistos de protozoários. Para a extração do DNA dos protozoários utilizou-se o kit DNeasy Tissue, a amplificação foi realizada com iniciadores específicos e o produto da PCR foi analisado em gel de agarose. As frequências nas fezes dos animais e fontes de água de consumo foram para *Cryptosporidium* spp. 1% e 0%, *Enterocytozoon* sp. 16% e 7%, *Entamoeba* spp. 54% e 13%, *Giardia* spp. 43% e 0%, *Blastocystis* sp. 27% e 0%, e de *Balantioides* spp. 16% e 47%. Fêmeas de ruminantes com aptidão leiteira apresentaram mais riscos que os machos de infecção por *Entamoeba* spp. Para este protozoário e *Blastocystis* sp. o sistema semi-intensivo foi determinante para a infecção de caprinos e suínos. *Giardia* spp. e *Balantioides* spp. foram os protozoários mais frequentes na água de consumo dos residentes e dos animais. No entanto, a frequência observada destes protozoários nas fezes dos suínos não foi determinante quanto ao sexo, sistema de criação ou manejo em relação a infecção. Desta forma podemos inferir que o poliparasitismo observado nesta pesquisa tanto nas fezes dos animais quanto na água de consumo caracterizam a importância destes protozoários na manutenção da infecção nos rebanhos e residentes de propriedades na Região da Zona da Mata Mineira e na saúde única local.

**Palavras-chave:** Protozoário entéricos; Saúde Única; Contaminação Ambiental.

## ABSTRACT

SILVA, A.V. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, March 2024. Assessment of infection by enteric protozoa of one health importance on rural properties through molecular diagnosis in feces and drinking water. Co-supervisor: Dr Samira Salim Mello Gallo. Advisor: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Parasites and parasitic diseases are of paramount importance for One Health, with transmission being related to socio-environmental factors and changes in the ecosystem. The present study aimed to identify protozoa, such as *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Enterocytozoon* sp., *Balantioides* spp., *Entamoeba* spp. and *Blastocystis* sp. in cattle, pigs, sheep, goats and in water sources for animal consumption and residents of rural properties in the Zona da Mata Mineira region, bordering the State of Rio de Janeiro. To this end, 288 fecal samples were collected for convenience, 100 from cattle, 74 from sheep, 63 from pigs and 51 from goats, in addition to 10 liters of water used for consumption. To concentrate protozoa in feces, the centrifugal-flotation technique was used with a hypersaturated sucrose solution (1.1g/mL). The water samples were pre-filtered with qualitative filter paper followed by new filtration with a glass fiber filter with the aid of a vacuum device to retain protozoan cysts and oocysts. To extract DNA from protozoa, the DNeasy Tissue kit was used, amplification was performed with specific primers and the PCR product was analyzed on an agarose gel. The frequencies in animal feces and drinking water sources were for *Cryptosporidium* spp. 1% and 0%, *Enterocytozoon* sp. 16% and 7%, *Entamoeba* spp. 54% and 13%, *Giardia* spp. 43% and 0%, *Blastocystis* sp. 27% and 0%, and *Balantioides* spp. 16% and 47%. Females of ruminants with dairy aptitude were more at risk than males of infection by *Entamoeba* spp. For this protozoan and *Blastocystis* sp. the semi-intensive system was decisive for the infection of goats and pigs. *Giardia* spp. and *Balantioides* spp. were the most common protozoa in the drinking water of residents and animals, respectively. However, the observed frequency of these protozoa in pig feces was not decisive regarding sex, farming system or management in relation to infection. In this way, we can infer that the polyparasitism observed in this research, both in animal feces and in drinking water, characterizes the importance of these protozoa in maintaining infection in herds and residents of properties in the Zona da Mata Mineira region and in local one health.

**Key-words:** Enteric protozoa; One Health; Environmental Contamination.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1.** Local de coleta de fezes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos e água de consumo dos animais e residentes, utilizadas para o diagnóstico molecular de protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* sp. e *Balantioides* spp.), importantes em saúde única..... 46
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose identificando os amplificadores do DNA genômico de protozoários de importância em Saúde única em fezes de animais de produção..... 47



## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Frequência de protozoários de importância em Saúde Única através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em fezes animais de produção.....	48
<b>Tabela 2.</b> Frequência de protozoários de importância em Saúde Única, verificada através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em fezes animais de produção em relação localização (cidades) onde se encontram as propriedades de coleta das amostras.....	49
<b>Tabela 3.</b> Frequência de protozoários de importância em Saúde Única através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em águas de consumo de animais e população residente em propriedades rurais.....	51
<b>Tabela 4.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	52
<b>Tabela 5.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de <i>Enterocytozoon</i> sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	53
<b>Tabela 6.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de <i>Entamoeba</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	54
<b>Tabela 7.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de <i>Giardia</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	55
<b>Tabela 8.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de <i>Blastocystis</i> sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	57

<b>Tabela 9.</b> Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Balantioides</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	58
<b>Tabela 10.</b> Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	59
<b>Tabela 11.</b> Risco relativo a aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Enterocytozoon</i> sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	59
<b>Tabela 12.</b> Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Entamoeba</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	60
<b>Tabela 13.</b> Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Giardia</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	60
<b>Tabela 14.</b> Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Blastocystis</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	61
<b>Tabela 15.</b> Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de <i>Balantioides</i> spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.....	62
<b>Tabela 16.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de bovinos.....	63

<b>Tabela 17.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Enterocytozoon</i> sp. em fezes de bovinos.....	64
<b>Tabela 18.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Entamoeba</i> spp. em fezes de bovinos.....	65
<b>Tabela 19.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Giardia</i> spp. em fezes de bovinos.....	66
<b>Tabela 20.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Blastocystis</i> sp. em fezes de bovinos.....	68
<b>Tabela 21.</b> Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de <i>Balantioides</i> spp. em fezes de bovinos.....	69

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	13
2.	<b>OBJETIVOS.....</b>	14
2.1.	GERAL.....	14
2.2.	ESPECÍFICOS.....	14
3.	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	15
4.	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	16
4.1.	<i>Cryptosporidium</i> spp. ....	17
4.2.	<i>Enterocytozoon</i> sp.....	21
4.3.	<i>Entamoeba</i> spp. ....	23
4.4.	<i>Giardia</i> spp. ....	26
4.5.	<i>Blastocystis</i> sp. ....	29
4.6.	<i>Balantioides</i> spp. ....	32
4.7.	<b>Diagnóstico parasitológico de protozoários .....</b>	35
4.8.	<b>Epidemiologia .....</b>	37
4.9.	<b>Prevenção e profilaxia .....</b>	38
5.	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	39
5.1.	<b>Local de Execução do Projeto .....</b>	39
5.2.	<b>Animais utilizados .....</b>	39
5.3.	<b>Isolamento dos protozoários a partir de amostras fecais .....</b>	39
5.4.	<b>Filtragem e processamento das amostras de água .....</b>	40
5.5.	<b>Diagnóstico Molecular .....</b>	40
5.5.1.	<b>Extração do DNA .....</b>	40
5.5.2.	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</b>	41
5.5.2.1.	<i>Cryptosporidium</i> spp. ....	41
5.5.2.2.	<i>Enterocytozoon</i> sp. ....	41
5.5.2.3.	<i>Entamoeba</i> spp. ....	42
5.5.2.4.	<i>Giardia</i> spp. ....	42
5.5.2.5.	<i>Blastocystis</i> sp. ....	42
5.5.2.6.	<i>Balantioides</i> spp. ....	43
5.6.	<b>Eletroforese em gel de agarose .....</b>	43
5.7.	<b>Estatística .....</b>	43
6.	<b>Resultados .....</b>	45

7.	<b>Discussão .....</b>	70
8.	<b>Conclusão .....</b>	82
9.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	83



## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação por protozoários entéricos com grande potencial zoonótico é considerada um problema de saúde única e vem se tornando uma situação negligenciada, pois representa necessidades médicas que permanece não atendida, inclusive na medicina veterinária e na vigilância sanitária animal. A transmissão está associada a fatores socioambientais, a alterações do ecossistema e do meio ambiente e, estes geralmente afetam pessoas e seus pets, que vivem em precárias condições socioeconômicas, bem como os animais de produção e residentes de propriedades rurais sem devidos cuidados sanitários. As doenças causadas por protozoários entéricos importantes em saúde única e outras relacionadas, se manifestam de modo silencioso e inaparente ou com sintomas clínicos inespecíficos a quadros de diarreia crônica e desnutrição e, ainda coopera com o surgimento de outras doenças concomitantes, o que pode culminar a altos índices de morbimortalidade.

O ambiente rural além dos problemas relacionados a saúde humana e animal, geram impactos relacionados à contaminação ambiental, com prejuízos econômicos aos produtores, pois, animais infectados, mesmo quando não apresentam sintomatologia clínica da doença, deixam de produzir de forma notável, afetando negativamente o sistema de produção, devido a interferências em seu desenvolvimento, ao efeito negativo na conversão alimentar com a redução no peso, incluindo a fertilidade. Vale ressaltar que animais de produção são de extrema importância econômica, pois fornecem uma considerável fonte alimentar e alternativas de renda, principalmente, em pequenas propriedades.

O Brasil é constituído por uma parcela significativa de pequenas propriedades tecnificadas, tradicionais ou do tipo familiar, que por apresentarem situações econômicas diferenciadas estão longe de possuir uma sanidade satisfatória em seus plantéis, onde muitos animais são criados em instalações simples com manejo sanitário pouco rigoroso ou livres em situação peridomiciliar. Assim, ao se eleger um tipo de exploração pecuária, é importante que se estabeleça um abastecimento de água de qualidade isenta de contaminantes biológicos, além de uma destinação adequada para águas residuais e excretas incluindo a garantia de cuidados especiais aos animais, a fim de evitar a disseminação destes protozoários de veiculação hídrica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Identificar molecularmente as principais protozooses zoonóticas, negligenciadas pela vigilância sanitária e importantes em Saúde Única em animais pecuários criados em propriedades rurais das cidades da região da Mata mineira divisa com o Estado do Rio de Janeiro e determinar fatores de risco da infecção.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Diagnosticar molecularmente as espécies de protozoários, principalmente os que oferecem potencial risco à saúde pública, como *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* sp. e *Balantioides* spp. em fezes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos através do isolamento, amplificação do DNA desses parasitos;
- Analisar o nível de contaminação ambiental das propriedades rurais mediante a comparação da presença desses protozoários entéricos e de veiculação hídrica nas fontes de águas;
- Determinar o Risco Relativo (Rr) de cada uma das atividades pecuárias na transmissão de doenças causadas pelos referentes parasitos, através dos resultados obtidos da pesquisa dos agentes etiológicos nas fezes dos animais;
- Definir os a razão de chance, ou seja, a chance de ocorrer a infecção dos protozoários nos animais em relação ao sexo, aptidão e manejo calculando-se o “odds ratio” (OR), de cada um dos fatores onde verificou-se Rr.



### 3. JUSTIFICATIVA

Microrganismos de potencial zoonótico são comuns em fezes de animais pecuários, o que determina cuidados especiais aos dejetos destes animais quando criados de forma intensiva, devido à concentração dos mesmos em pequenas áreas e o alto acúmulo dos dejetos, que em consequência do pisoteio e pastoreio constante, são incorporados ao solo e provavelmente carregados ao subsolo contaminando o lençol freático. O mesmo acontece em pequenas propriedades rurais onde a pecuária leiteira é a principal atividade, pois, além da possível contaminação de águas subterrâneas, também há a ocorrência da contaminação das águas superficiais, por vezes utilizadas como fonte de consumo para os animais, devido a uma grande quantidade de dejetos são carregados durante a lavagem dos estábulos. Sabendo-se que no Brasil, as doenças de veiculação hídrica estão presentes de forma enzoótica nos rebanhos, com distribuição em todo o território nacional, há necessidade de monitoramento constante dessas doenças, principalmente no que tange ao contato desses animais com o homem.

Atualmente existe uma escassez de dados baseados em biologia molecular relativo a circulação destes microrganismos no Brasil, pois, a maioria das pesquisas ainda são realizadas por técnicas baseadas em microscopia. No entanto, mesmo que alguns destes microrganismos possam ser identificados por meio de técnicas convencionais em microscopia óptica, os estudos moleculares através da técnica de PCR ou RFLP, permite uma identificação correta e segura. Além disso, as técnicas moleculares são comprovadamente mais sensíveis que às de microscopia, o que minimiza, portanto, as chances de ocorrência de resultados falso-negativos em amostras com pouca quantidade dos agentes etiológicos de gastroenterites provocadas por patógenos entérico e veiculadas pela água contaminada. Por isso, também é necessário efetuar uma reavaliação do papel desempenhado pela água na propagação de agentes causais de parasitoses, sendo pouco conhecido seu papel como veículo de transmissão de protozoários provenientes dos animais.

#### 4. REVISÃO DE LITERATURA

A Região da Zona da Mata Mineira é uma área que ocupa aproximadamente 6,09% do estado de Minas Gerais, é composta pela junção de pequenos municípios com baixo índice populacional e de urbanização, dotados de uma economia inferior em comparação aos demais potencialidades regionais. Esta foi marcada intensamente pelo período colonial e, devido a considerável oferta de minérios o advento do setor industrial, grande parte das florestas e dos recursos naturais aos poucos, cederam lugar as plantações de café e posteriormente as vastas pastagens. No entanto, esta região sofreu intensos desgastes econômicos devido a perda da primazia e política e econômica em razão ao privilégio cedido as demais regiões do estado e, desse modo, a agropecuária se tornou a atividade mais desenvolvida em quase sua totalidade por pequenos produtores, sendo muitos destes isentos do conhecimento acerca dos cuidados sanitários necessário para com os rebanhos (NETO; DINIZ, 2006).

Nos países em desenvolvimento as doenças infecciosas representam uma séria ameaça à saúde única e geram perdas econômicas substanciais para indústria pecuária, que, atualmente, é tencionada para proporcionar a segurança alimentar à nível mundial (AHMED et al., 2019; HOLLNAS et al., 2022). No entanto, devido à alta densidade populacional, as atividades de manejo otimizaram a produtividade, tornando a exploração mais intensa, com a ampliação de sistemas produtivos e a criação em larga escala de animais em criadouros. Assim, pode-se afirmar, que a pecuária, coopera com a disseminação dos agentes parasitários, através da diminuição dos recursos naturais e o aumento significativo de emissão de gases poluentes, incluindo a poluição do solo e das fontes de água subterrâneas e superficiais, utilizadas para fins de consumo, recreativos e de cultivo (YITBAREK, 2019; GOLOMAZOU et al., 2024;).

Algumas pessoas e animais mesmo infectados podem permanecer assintomáticos ou apresentar alguns sintomas leves que podem vir a ser confundidos com outras doenças. Por esse motivo, as doenças parasitárias são constantemente negligenciadas, pela medicina humana e veterinária, além da vigilância sanitária e a maioria das indústrias farmacêuticas, que por vezes não demonstram interesse ao desenvolvimento de pesquisas, voltadas a profilaxia e o avanço terapêutico, incluindo a fabricação de vacinas. Pois, as doenças parasitárias estão associadas a pobreza extrema e geralmente acomete pessoas marginalizadas e de baixa renda, que não são consideradas o foco de um mercado atraente e, na maioria das vezes, não conseguem custear os medicamentos disponíveis no mercado (ANDRADE; ROCHA, 2015).

Fato este, que tem cooperado com a potencialização do caráter zoonótico e para a expansão geográfica dos parasitos que tem se tornado as causas de infecções mais comuns em

todo o mundo, atingindo cerca de 50% da população mundial (ROCHA, 2017). *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* sp., *Balantioides* spp. são protozooses consideradas como uns dos maiores entraves da produção brasileira, afetam negativamente o sistema de produção, principalmente, animais juvenis (BARBOSA et al., 2015a). A pecuária brasileira é uma atividade altamente expressa pela heterogeneidade, é composta por grandes complexos produtivos integrados, pequenos produtores sazonais e famílias de subsistência, que estão distribuídas por todo território nacional e, por vezes, dependem exclusivamente destas atividades ou as mantêm como um complemento às demais práticas, bem como a agricultura, por esse motivo, torna-se necessário a manutenção da saúde dos rebanhos (PEREIRA, 2003; YAMAGUCHI et al., 2006).

#### **4.1. *Cryptosporidium* spp. (Ernest Tyzzer, 1907)**

São protozoários que estão inseridos ao Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Gregarinomorpha, Subclasse Cryptogregarina e Família Criptosporidiidae (RYAN et al., 2016). Inicialmente este gênero pertencia à Classe coccidia, no entanto, o avanço em técnicas moleculares e microscópicas permitiram um estudo minucioso em relação ao desenvolvimento e comportamento biológico dessas espécies, destacando certas características peculiares, como a possibilidade de autoinfecção endógena, sítio de infecção, transmissibilidade cruzada e relativa especificidade. O que possibilitou o estabelecimento de diferenciações com os demais pertencentes à subclasse Coccidiasina. (BARTA; THOMPSON, 2006; SMITH et al., 2007; CAVALIER-SMITH, 2014). Dentro deste gênero são observados em média 44 espécies e 120 genótipos reconhecidos com amplo espectro de hospedeiros vertebrados. Desse total, cerca de 21 espécies já foram relatadas em humanos, sendo as infecções por *C. parvum* e *C. hominis*, as mais comumente identificadas, chegando a atingir uma média de 90% dos casos (SLAPETA, 2013; LI et al., 2020; RYAN et al., 2021). Enquanto as espécies *C. andersoni*, *C. muris*, *C. ubiquitum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus* estão entre as demais espécies, que além de infectar humanos, são responsáveis por certos casos de surtos zoonóticos, mediante o contato com animais infectados (AHMED; KARANIS; 2020).

As espécies de *Cryptosporidium* spp. são reconhecidas devido à baixa especificidade e destacam-se pelo potencial zoonótico, pela ampla capacidade de disseminação, resistência e sobrevivência no meio ambiente (FENG et al., 2018). Ademais, além da via de transmissão comum, seus oocistos também podem ser transmitidos através de insetos como baratas, moscas, besouros ou algumas espécies de rotíferos, que também agem como potenciais vetores e casos

raros de inalação também já foram relatados como um mecanismo raro de transmissão (O'DONOGHUE, 1995; DILLINGHAM et al., 2002). Vale lembrar que a ingestão de apenas um oocisto também pode desencadear de modo potencial, um quadro infeccioso (CARMENA, 2010; MESSNER; BERGER, 2016).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são observados sob a forma esférica, ovoide ou elíptica e medem cerca de 3,2 a 8,3  $\mu\text{m}$  de diâmetros a depender da espécie. Estes são revestido por uma parede com três camadas, somadas a uma linha de sutura, onde emergem os quatro esporozoítos contidos em seu interior (TOMAZIC et al., 2018). Após a ingestão dos oocistos, ocorre seu desencistamento no lúmen do intestino delgado, devido a ação da temperatura luminal, sais biliares, pH e das enzimas digestórias (LENDNER; DAUGSCHES, 2014). Todos esses fatores cooperam com a liberação dos esporozoítos, estruturas infecciosas, alongadas, de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de comprimento, envoltas por uma película, com a porção anterior formada por um complexo apical, que detém a função de facilitar o processo de invasão à célula hospedeira (SMITH et al., 2005; DEL COCO et al., 2009).

Os esporozoítos apresentam demais estruturas como anéis apicais, conóides e organelas secretoras na porção anterior e, na porção central, estruturas como núcleo, complexo de Golgi, ribossomos e grânulos de amilopectinas (SMITH et al., 2005). Durante o processo de penetração celular, as organelas secretoras, classificadas como róptrias e micronemas e grânulos densos, liberam substâncias nas células gastrointestinais, o que permitem a movimentação e deslizamento dos parasitos (BOROWSKI et al., 2008). Assim ao atingirem a região epitelial, estes induzem a formação de vacúolos parasitóforos, estruturas membranosas revestidas por epimerito, onde decorre todo ciclo do parasito e permite a captura de nutrientes dos enterócitos (CLODE et al., 2015).

No interior dos vacúolos os esporozoítos se desenvolvem em trofozoítos e chegam a atingir em média 1,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Então, inicia-se à reprodução assexuada com divisões binárias celulares, seguidas de dois ciclos de merogonia, que culminam com a formação de merontes tipo I e do tipo II. Os merontes do tipo I apresentam em média de 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e contém em seu interior oito merozoítos, que quando liberados atingem novas células e podem tanto originar novamente merontes do tipo I quanto do tipo II da segunda geração. Estes podem atingir 3,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, apresentam um formato fusiforme e uma membrana externa mais espessa e organelas constituintes do complexo apical (BOROWSKI et al., 2010; TOMAZIC et al., 2018). Estes são precursores da reprodução sexuada, penetram novos enterócitos e se diferenciam em microgamontes, gametas masculinos e em macrogamontes, gametas femininos. Os microgamontes se apresentam sob a forma

arredondada, multinucleada e medem aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$ , desse modo, cada núcleo gera microgametas esféricas, de 0,1  $\mu\text{m}$ , que após a liberação, migram e fecundam os macrogametas, formas uninucleadas, sésseis evoluídas de macrogamontes de aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ , que permanecem no interior das células. (BOROWSKI et al., 2010). Como resultado da fertilização emergem os zigotos com em média de 1,5 a 2,9  $\mu\text{m}$ , que por meio da meiose e do processo de esporogonia geram quatro esporozoítas, que permanecem no interior dos oocistos contendo amilopectinas, as responsáveis pela formação da parede cística (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018; TOMAZIC et al., 2018; TZIPORI; WARD, 2002).

Desse modo, tipos de oocistos podem ser formados, aqueles compostos de uma parede fina, incumbidos para desencadear a autoinfecção no hospedeiro, através da amplificação da quantidade de parasitos no intestino delgado e, os dotados de uma parede espessa, que são excretados em conjunto com as fezes no ambiente (DEL COCO et al., 2009; TOMAZIC et al., 2018) O ciclo destes protozoários é monoxeno e os estágios gastrointestinais ocorre em sua totalidade em apenas um hospedeiro e, a depender do seu genótipo, pode conter um caráter zoonótico (LODI, et al., 2022).

Parasitos deste gênero são agentes intracelulares minimamente invasivos, não penetram profundamente nos tecidos infectados, mantendo um ciclo de vida apicalmente nos enterócitos (CERTAD et al., 2017). Enquanto os oocistos, podem se sobreviver em diferentes meios no ambiente extracelular, ademais, o ambiente aquático é considerado uma de suas principais fontes, devido a considerável capacidade de permanência em biofilmes em estações de tratamento e abastecimento, resistindo à diferentes métodos químicos de purificação e cloração (HIJAWI et al., 2002; KOH et al., 2013; CLODE et al., 2015).

*Cryptosporidium* spp. foi observado pela primeira vez em 1907 no epitélio gástrico de camundongos, pelo médico parasitologista Ernest Edward Tyzzer, todavia, somente em 1955 tornou-se alvo de pesquisas e foi associado como um agente causador de doenças em animais, devido sua identificação em fezes diarreicas de perus e, a partir de 1970 após relatados em bezerros, também passou a ser reconhecido por seu potencial zoonótico (PANCIERA et al., 1971; NIME et al., 1976). No entanto, seguidos seis anos, foi observado sua importância para saúde única, após ser identificado como parasitos de humanos e de veiculação hídrica (D'ANTÔNIO et al., 1985; CURRENT et al., 1983; HAYES et al., 1989; SMITH; ROSE, 1998). No Brasil, o primeiro registo de criptosporidiose humanos ocorreu em 1985 e desde então tem se tornado um alerta mundial (WEIKEL et al., 1985). Este parasito se encontra largamente distribuído entre os países subdesenvolvidos do Continente Americano e Africano, incluindo países desenvolvidos como os Estados Unidos (GOLOMAZOU et al., 2024). Fato

este que insere este gênero como uma das quatro causas mais comuns de distúrbios entéricos diarreicos, sendo destaque em 2017 como o principal agente etiológico relacionados a surtos de origem hídrica, associado a milhões de casos anuais de doenças transmitidas por alimentos, além disso, também foi notificado como o responsável pelas doenças diarreicas que culminaram com a morte de cerca de 1,5 milhões de pessoas, sendo a grande maioria crianças (EFSTRATIOU et al., 2017; AHMED; KARANIS, 2018; RYAN et al., 2018; DATTANI et al., 2023). Assim, estas espécies são vistas como importantes patógenos, responsáveis de vários surtos relatados, principalmente em creches, com uma despesa de milhões de euros, que são investidos em casos clínicos de criptosporidiose crônica, representando uma considerável parcela da carga global de doenças parasitárias de veiculação hídrica, de origem alimentar e zoonóticas (GOLOMAZOU et al., 2024; FENG et al., 2018).

Os surtos de criptosporidiose em animais de produção ocorrem geralmente em criações intensivas, em decorrência a práticas de pastoreio misto, a ingestão de forragem e água compartilhada em recintos contaminados com oocistos, (DEL COCO et al., 2009). Em bovinos, por exemplo, a frequência de contaminação por *Cryptosporidium* spp. varia de 3,4% a 96,6% e as infecções geralmente são causadas por *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (THOMSON et al., 2017; O'DONOGHUE, 1995). Os bovinos pertencem ao grupo de animais mais criticamente infectados por *Cryptosporidium* spp. e desempenham um papel significativo na dispersão dos oocistos, devido a sua produção em larga escala com grande importância econômica, a ampla utilização de esterco para adubação e a capacidade em hospedar diferentes espécies deste gênero, incluindo *C. hominis* (OLIVEIRA et al., 2021; SANTÍN, 2013; THOMSON et al., 2017; GOLOMAZOU et al., 2024).

A criptosporidiose tende a ser autolimitada com duração de apenas duas semanas, mas sua prevenção ainda é um desafio e as medidas de controle não garantem a eliminação total dos oocistos no ambiente (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018). Existem alguns medicamentos disponíveis no mercado com propriedades antiprotozoárias, que apresentam em sua composição, lactato de halofuginona ou paramomicina como substâncias ativas, atuam no combate dos estágios livres do protozoário ou na eliminação parcialmente dos oocistos, como os esporozoítos e merozoítos, o que permite a redução de sintomas indesejáveis. (INTERVET INTERNATIONAL, 2022).

Acredita-se que os genomas de algumas espécies, difiram em importantes etapas metabólicas dos demais microrganismos apicomplexos, o que pode explicar as falhas no tratamento da criptosporidiose. Ademais a localização intracelular, no sentido extracitoplasmático é biologicamente algumas das características, que conduz a extrema

resistência aos agentes antimicrobianos. No entanto, pesquisas recentes demonstram que antígenos como gp60 e a p23 presentes na superfície dos esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. foram identificados como possíveis alvos que podem compor os constituintes de futuras vacinas (TOMAZIC et al., 2018).

#### **4.2. *Enterocytozoon* sp. (Desportes, 1985)**

Pertence ao Reino Protozoa, Filo Microsporidia, Classe Microsporea, Ordem Microsporida, Subordem Apansporoblastina e Família Enterocytozoonidae (CHINCHILLA, 1997). Microsporidia corresponde a um amplo grupo de parasitos intracelulares obrigatórios que incluem mais de 1200 espécies (MATHIS WEBER, 2005). No entanto, até o momento, o gênero *Enterocytozoon* é considerado monoespecífico, com apenas uma espécie descrita, *E. bienersi* e 192 genótipos relatados em acordo com a análise da região ITS. Destes, aproximadamente 52 foram relatados em humanos, 106 são provenientes de hospedeiros-específicos e 34 são zoonóticos (SANTÍN, 2015; SULAIMAN, et al., 2003).

A taxonomia do filo Microsporidia é considerada uma problemática desde a sua descoberta. Análises moleculares iniciais, do gene 18S rDNA, demonstraram que este filo poderia caracterizar uma das primeiras linhagens eucariontes divergentes (VOSSBRINCK et al., 1987). Análises filogenéticas subsequentes, utilizando diferentes genes, relatam uma possível origem fúngica dos microsporídeos, enquanto demais análises sugerem que estes microsporídios mantêm uma relação com os fungos em razão a produção de esporos e, por esse motivo, apenas agrupados como um ramo ou grupo considerado “irmãos” dos fungos (FISCHER; PALMER, 2005).

Infecções por *E. bienersi* frequentemente são diagnosticadas em todo o mundo e é considerado um patógeno de uma ampla gama de hospedeiros incluindo humanos, sendo também considerado um insigne oportunista em pacientes imunocomprometidos (LOBO et al., 2012). Análises moleculares revelam que os genótipos relatados em múltiplos animais selvagens, possam ser idênticos ou geneticamente relacionados a aqueles que infectam humanos e animais domésticos, o que indica alguns casos de especificidade, parasitismo múltiplo ou adaptação ao hospedeiro, além de um possível polimorfismo genético o que ressalta a importância dos reservatórios animais e fontes de água na epidemiologia desse parasito (SULAIMAN, et al., 2003; SANTÍN, 2015).

O esporo é considerado a fase infectante do parasito e além de ser uma estrutura de alta resistência, é a única que pode ser detectada no ambiente extracelular. Os esporos são ovais

medem em média 0,5 a 1,5 µm de comprimento e permanecem envoltos por uma camada de glicoproteína e por uma membrana plasmática, em seu interior apresenta apenas um núcleo imerso no citoplasma, no qual é considerado o material infectante (KEELING; FAST, 2002). Estes possuem um aparelho de extrusão composto por um disco de ancoragem, tubo polar e polarplasto, estruturas que permitem a penetração e infecção da célula hospedeira (SANTÍN et al., 2010). Ademais apresentam em sua composição pequenos ribossomos, porém, são isentos de estruturas como complexo de Golgi, peroxissomos e mitocôndrias (SANTÍN, 2015).

O ciclo de vida do parasito tem início com a ingestão dos esporos pelo hospedeiro, estes empregam os tubos polares para inoculação de seu conteúdo no citoplasma e núcleo das células hospedeiras. Desse modo, inicia-se o processo de infecção, com o surgimento dos primeiros estágios proliferativos, seguidos do crescimento e a divisão do parasito e o desenvolvimento do aparelho de extrusão. Após a proliferação, surgem as primeiras células contendo múltiplos núcleos individuais alongados, inclusões eletrodensas e o plasmódio esporogonial que expõe seus discos eletrodensos empilhados, culminando com o desenvolvimento do aparelho de extrusão. Durante a divisão esporogonial, os núcleos individuais contendo complexos de tubos polares, segregam-se, sofrem maturação e se desenvolvem em esporoblastos, que após evoluir para fase de esporos maduros, são excretados em conjunto com as fezes (DESSPORTES et al., 1985; AKIYOSHI et al., 2009).

*Enterocytozoon bieneusi* é um patógeno emergente e as infecções geralmente permanecem restritas ao trato gastrointestinal, principalmente jejuno e duodeno, sendo a diarreia o principal sintoma clínico. Em indivíduos imunossuprimidos soronegativos a infecção tende a ser auto limitante e alguns casos raros pode migrar para o trato respiratório (SANTÍN, 2015; MOLINA et al., 1993; BOTTEREL et al., 2002; SODGI et al., 2004). Dentre os animais de produção, os suínos são os detentores de uma maior prevalência, o que indica que estes animais por vezes assintomáticos, possam ser considerados potenciais reservatórios e ainda apresentar-se como um novo modelo animal para enterocitoozoonose (DENGIEL et al., 2001; SANTÍN et al., 2006).

Historicamente, este gênero foi identificado a partir de infestações nos enterócitos de um paciente haitiano positivo para o HIV (DESSPORTES, et al., 1985). Enquanto o primeiro relato em animais, se obteve na Suíça por meio de observações dos esporos em fezes diarreicas de suínos juvenis, que continham diferentes sequências de nucleotídeos de genótipos ITS, com uma frequência de positividade de 97%, confirmando a presença do parasito (DEPLAZES et al., 1996). Estas sequências apresentavam uma certa semelhança em relação aos encontrados em humanos, no entanto, somente através de uma pesquisa que envolveu a transmissão de



genótipos provenientes de humanos e primatas não humanos à suínos gnotobióticos imunossuprimidos, foi possível a percepção do caráter zoonótico desse parasito (KONDOVA et al., 1998).

#### 4.3. *Entamoeba* spp. (Fedor Losch, 1875)

Segundo o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia, 1980, este gênero pertence ao Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Subclasse Gymnamoebia, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina, Família Entamoebidae (REY, 2010). Engloba várias espécies, classificadas quanto ao número de núcleos de cistos maduros, assim, as tetranucleadas pertencem ao Complexo histolytica, patogênicas, caracterizadas por *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii* e demais comensais (SILVA; GOMES, 2011).

Devido à falta de típicas organelas “mitocondriais” eucarióticas, esse gênero foi considerado uma relíquia viva, um paradigma para a célula eucariótica mais antiga, sendo considerado o grupo existente mais primitivo “Archezoa” (CLARK, 2000; BALDAUF, 2008). Esse antigo protozoário é um exemplo elementar de como os parasitas evoluem com os animais, se beneficiam de diferentes mecanismos para esquivar-se do sistema imunológico e interagem com a microbiota para suprir necessidades nutricionais e protetoras. Além disso, utilizam recursos de seus hospedeiros para seu desenvolvimento, crescimento e divisão, o que resulta na perpetuação da espécie e incidência da infecção (GUILLÉN, 2022).

Historicamente, Lösch em 1875, através de estudos microscópicos e clínicos fez uma associação entre disenteria e presença de organismos em fezes e os denominou de *Amoeba coli*, (ACKERS, 2002). A infecção amebiana tem início com a ingestão de resíduos fecais contidos em alimentos ou na água contendo cistos do parasito, assim, duas situações distintas podem ocorrer após a invasão dos ameboides no organismo do hospedeiro, o ciclo biológico monoxênico, em que o parasito se limita a luz intestinal e se apresenta com quatro estágios evolutivos, o pré-cisto, cisto, metacisto e trofozoíto, enquanto o ciclo o patogênico faz referência a invasão tecidual, que culmina com um quadro de amebíase invasiva. (MORAN et al, 2005).

Os cistos são estruturas infectantes, esféricas, resistentes e medem cerca de 10 a 16 µm de diâmetro, apresentam de 1 a 4 núcleos revestidos com grânulos de cromatina, cariossoma central reduzido e sua parede celular é composta de polímeros. Seu citoplasma possui um vacúolo com glicogênio, uma membrana nuclear imperceptível e corpos cromatóides

compostos de ácido ribonucleico. Ao atingem o intestino delgado, na porção terminal do íleo, realizam o desencistamento com a liberação do metacisto, através de uma ínfima fenda da parede cística (STANLEY JÚNIOR, 2003; DIAMOND; CLARK, 1993).

O metacisto refere-se a uma forma multinucleada intermediária que sofre diversas divisões nucleares e citoplasmáticas originando em média oito trofozoítos metacístico (SILVA; GOMES, 2011). Estes migram para o intestino grosso, onde permanecem aderidos a parede da mucosa do cólon transverso e são nutridos por meio da pinocitose e fagocitose, com algumas espécies de bactérias e restos celulares. São organismos anaeróbios, mas, são capazes de se desenvolver em atmosfera contendo 5% de oxigênio (TANYUSKEL; PETRI, 2003).

Os trofozoítos são estruturas ativas e móveis, com diâmetro que pode variar de 20 a 40  $\mu\text{m}$ , são pleomórficos, com um núcleo evidente, medindo 4 a 7  $\mu\text{m}$ , além do cariossoma central, uma membrana nuclear delgada e cromatina uniforme (TANYUSKEL; PETRI, 2003). Estes emitem de forma ligeira seus pseudópodes, responsáveis pela sua locomoção e nutrição, momento em que o núcleo se torna imperceptível (SILVA; GOMES, 2011). O citoplasma apresenta vacúolos distintos com um ectoplasma claro e hialino e endoplasma de aspecto granuloso (PERDOMO et al., 2015).

O elevado número de parasito no hospedeiro é resultante da fissão binária dos trofozoítos que colonizam o lúmen e a mucosa do intestino grosso (SHIRLEY; MOONAH, 2016). As populações amorfas se mantêm agregadas e atingem altas densidades, devido exacerbado crescimento exponencial, considerado o parâmetro chave para determinar a infecção no hospedeiro ou contribuir para o encistamento, com a formação dos cistos. Vale ressaltar que a microbiota age como um meio adaptado para aumento da densidade dos trofozoítos, o que culmina com um considerável desequilíbrio entre hospedeiro e parasito. (GUILLÉN, 2022). No entanto, a colonização em massa e a privação alimentar, gera uma limitação dos recursos e uma desaceleração no metabolismo do animal, que torna o ambiente desfavorável para o crescimento e divisão do parasita, que opta pela transição e formação de uma estrutura mais resistente, pré-cisto (SHIRLEY; MOONAH, 2016).

Para tanto, trofozoítos retraem suas projeções, sofrem desidratação, adquirem um formato arredondado e reduzido, desprendem-se do substrato, se unem em aglomerados multicelulares e transformam-se em pré-cistos (KRISHNAN; GHOSH, 2020). Estruturas intermediárias com um citoplasma que apresenta o corpo cromatóide sob a forma de bastonetes, que com a formação da membrana cística, evoluem para cistos mononucleados, que após sucessivas replicações cromossômicas sem divisão celular, amadurecem em cistos

tetranucleares, completando o ciclo biológico do parasito (MOUSA et al., 2020; SINGH et al., 2021).

Estes são comumente observados nas fezes do hospedeiro e correspondem a um estágio evolutivo detento de um metabolismo reduzido, que garante sua sobrevivência no ambiente extracelular e a resistência a tratamentos como a cloração e acidificação, todavia, sendo não resistem a temperaturas extremas (HUSTON et al., 1999; TANYUSKEL; PETRI, 2003; SAMIE et al., 2012). Até o momento somente a espécie *E. gingivalis*, responsável pela colonização da cavidade oral e já relatada no trato geniturinário feminino, foi relatada como um amebídeo que não produz cistos (STENSVOLD et al., 2010).

O ciclo patogênico, geralmente é realizado apenas por trofozoítos da espécie *E. histolytica*, que apresentam um tamanho relativamente maior, com em média 60 µm de comprimento em lesões teciduais, devido a intensa atividade fagocitária e abundância de vacúolos digestivos em seu citoplasma, contendo hemácias, leucócitos e bactérias. Neste ciclo, também ocorre sucessivas divisões binárias, no entanto, a invasão tecidual tem início com a colonização dos ameboides na parede intestinal, além da mucosa e submucosa do ceco, reto sigmoide e outras porções do intestino grosso (REY, 2010).

Estas estruturas secretam proteases que promovem a destruição da matriz extracelular, invadem a parede intestinal conduzindo a infecção através de abscessos amebianos, sem a formação de cistos e com a indução de pequenas úlceras expostas para a luz intestinal, que se intensificam em uma extensa área ulcerada, propiciando a colonização dos demais microrganismos agravando significativamente o prognóstico do paciente, promovendo ou exacerbando sintomas clínicos, como dores abdominais, disenteria com sangue e muco e necrose intestinal (REY, 2010).

Os trofozoítos presentes nas úlceras adquirem potencial para invadir a corrente sanguínea e migrar para demais órgãos como o fígado, culminando com uma necrose de liquefação, coagulação e danificação do tecido. Assim, posteriormente a infecção pode migrar para órgãos nobres como pulmão e cérebro, além dos rins e tecido cutâneo, culminando em amebíase extra intestinal (SILVA; GOMES, 2011). A ocorrência da colite amebiana fulminante é uma manifestação clínica incomum, mas, que pode ser fatal (SHIRLEY; MOONAH, 2016).

Esses amebídeos infectam todas as classes de vertebrados e alguns invertebrados, incluindo animais domésticos e selvagens e exibem um alto potencial zoonótico, fato esse, relatado com a espécie de *E. nuttalli*, detectada em um zelador de zoológico, local onde esses parasitos ocorrem com grande frequência, devido a presença de animais selvagens (LEVECKE et al., 2015). Todavia, as demais espécies de amebídeos parasitos de animais de produção, como

os suínos, por vezes, são considerados por alguns autores como não patogênicos, devido os poucos relatos que descreveram a patogenicidade nesses animais. Porém, demais espécies como espécie *E. polecki*, relatada principalmente em suínos, também tem sido evidenciada infectando seres humanos e animais selvagens, incluindo *E. suis* que invade a mucosa intestinal e fagocitam células sanguíneas, promovendo ou exacerbando sintomas clínicos, como colite hemorrágica ou diarreia nestes animais. (MATSUBAYASHI et al., 2014).

Demais estudos indicam que *E. bovis* também pode ser isolada de outros hospedeiros além do gado com alto potencial de infecção (STENSVOLD et al., 2010). Assim, todos esses fatos demonstram que esses parasitos apresentam fenótipos e habilidades diferenciais que pode causar doenças entre diferentes espécies de animais (DAS; GANGULY, 2014; WEEDALL; HALL, 2011). Enquanto as espécies de maior importância clínica são *E. histolytica* e *E. moshkowskii*, que podem determinar quadros clínicos sintomáticos consideráveis e classificado como um patógeno prioritário de biodefesa de categoria B, de acordo o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) em 2018. No Brasil, apesar das condições favoráveis para a *E. histolytica*, há uma relativa predominância da espécie *E. dispar* (SHIRLEY et al., 2018).

Em 10% dos casos o parasita pode se transformar em um patógeno, com a aquisição de um fenótipo virulento, devido a agilidade em gerar sequências genômicas inteiras com fenótipos virulentos. Dados de genômica evolutiva, indicam que certas espécies de *Entamoeba* spp. podem se envolver em uma recombinação genética durante seu ciclo biológico ou sofrerem diferentes influências de fatores como da microbiota autóctone ou de ambientes desconhecidos (CLARK, 1998; CUI et al., 2019). Assim, atualmente é relatada como uma doença parasitária com grande frequência de relatos entre os países da América Central, América do Sul, África e Ásia, onde é considerada endêmica. (GUILLÉN, 2022).

Pesquisas voltadas para a prevenção dessa doença permanece como um verdadeiro desafio, a alta complexidade e a virulência que são exibidas entre as diferentes espécies de *Entamoeba*. O principal tratamento para a amebíase invasiva são os nitroimidazóis uma vez que não existe vacinas para prevenir a amebíase, no entanto, novas terapias ainda são necessárias devido à toxicidade dos nitroimidazóis e possíveis preocupações com o desenvolvimento de resistência (CAEIRO et al., 2019). Novos caminhos de pesquisa emergentes e tecnologias ômicas visam a regulação de genes para determinar fatores dos hospedeiros ou parasitários ativados na infecção, seu papel na ativação de virulência e na patogênese (GUILLÉN, 2022).

#### **4.4. *Giardia* spp. (Kunstler, 1882)**

Atualmente classificada no Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida, Família Hexamitidae (THOMPSON, 2004). A classificação das estirpes de *Giardia* spp. a nível de espécie permanece em controvérsia e, com base no tipo de hospedeiro e na morfologia do parasito, foi proposto o reconhecimento das espécies *G. agilis*, que parasitam rãs e girinos, *G. muris*, roedores e *G. microti*, roedores do campo *G. ardeae* e *G. psittaci* relatadas em aves e *G. duodenalis* que infecta uma ampla gama de mamíferos e inclui as estirpes *G. lamblia* e *G. intestinalis* (THOMPSON et al., 2000; VAN KEULEN et al., 2002; MONIS et al., 2003).

*Giardia duodenalis* é um complexo de espécie que compreende oito genótipos principais (assemblages), constituídos por populações morfologicamente indistinguíveis, com grande variabilidade genética, caracterizados sob critérios fenotípicos e genotípicos por (A, B, C, D, E, F, G e H) (MONIS et al., 2003; ELEGIO-GARCIA et al., 2005; VOLOTÃO, et al., 2007). O conjunto comumente relatado em animais de fazenda, pertencem ao grupo genético genótipo-específico (E) que infecta ruminantes domésticos e suínos, enquanto os grupos genéticos com genótipos (A e B) são potencialmente zoonóticos, pois além dos animais de produção, abrange humanos, animais de companhia, selvagens e demais mamíferos, destacando os papéis estabelecidos tanto pelo homem quanto pelos animais na transmissão da giardíase (PLUTZER et al., 2010).

Estes enteroparasitos são flagelados, unicelulares e geneticamente complexos (SULAIMAN et al., 2003) identificados por Kunstler em 1882, quando observou microrganismo flagelado no intestino de girinos de anfíbios anuros (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000). As espécies desse gênero, possuem oito flagelos e um par de núcleos dispostos simetricamente na porção anterior e na região ventral, onde também é possível observar a presença de “ventosas”, estruturas em forma de um disco de sucção, responsáveis pela adesão na parede do intestino do hospedeiro (SINGLETON, SAINSBURY, 2001).

*Giardia* spp. apresenta dois estágios bem definidos durante seu ciclo biológico, o cisto e trofozoíto. O cisto é a forma infectante e altamente resistente, devido a presença de uma parede celular espessa, este também contém estruturas como fragmentos do disco ventral e quatro núcleos. O trofozoíto, é considerado a forma vegetativa do parasito, apresenta dois núcleos semelhantes na parte anterior, um disco ventral, dois corpos medianos e quatro pares de flagelos. O ciclo de vida é monoxênico e tem início após a ingestão da forma cística, que sob estímulos do baixo pH gástrico e enzimas pancreáticas, sofrem rompimento de suas

paredes, com a liberação do excizoíto, que se multiplica e origina quatro trofozoítos (CACCIÒ; LALLE, 2015).

Estes, se aderem à mucosa intestinal e sob condições favoráveis, se desenvolvem e coloniza a superfície da mucosa intestinal, iniciam o processo de reprodução assexuada, multiplicando-se por fissão binária e utiliza-se de nutrientes presentes na mucosa luminal e intestinal (BARR et al., 1994; THOMPSON, 2004). Estes protozoários não são invasivos, entretanto, estruturas como o citoesqueleto e o disco ventral desempenham um papel fundamental para a sobrevivência do organismo no intestino do hospedeiro. A medida que atravessam o intestino delgado, se encistam no jejuno e são excretados em conjunto com as fezes, concluindo o ciclo em um período de incubação com durabilidade de em média quatro a sete dias (ADAM, 2001). O encistamento promove a resistência do parasito mediante as condições adversas do meio (FARTHING, 1996).

*Giardia duodenalis* é conhecida como a causa mais comum de diarreia não bacteriana, é comumente relatada em escoamento agrícolas e afeta principalmente bezerros neonatais, o que pode indicado na frequência média mundial de 25,56% destes animais que eliminam cistos no ambiente (MC ALLISTER et al., 2005). Em países da Ásia, África e América Latina, aproximadamente 200 milhões de pessoas apresentam giardíase com quadros sintomáticos, onde a mesma também está associada ao retardo do crescimento e do desenvolvimento, precárias funções cognitivas e efeitos nocivos sobre o estado nutricional (BERKMAN et al., 2002). Ademais, nessas regiões as frequências de infecção dos rebanhos são altamente elevadas chegando a atingir 100%, culminando com consideráveis prejuízos (OLSON et al., 2004; O' HANDLEY et al., 2000; HUETINK et al., 2001).

Este parasita não apresenta um padrão específico de sensibilidade antimicrobiana e há uma escassez de estudos publicados que tenham avaliado os protocolos terapêuticos, quanto a dose, eficácia e a toxicidade da maioria dos fármacos utilizados. Geralmente o tratamento a ser prescrito para os animais infectados inclui medicamentos à base de antibióticos e antiparasitários, todavia, muitos casos crônicos não são responsivos ao tratamento e a probabilidade de reinfeção é grande (ALOÍSIO et al., 2006). Alguns estudos de caracterização molecular do gene que codifica a subunidade 18S do rRNA, vem sendo largamente utilizado por se tratar de uma região conservada, para diferenciar as espécies de *Giardia* e assemblages de *G. duodenalis* e, desse modo, auxiliar na identificação e caracterização das espécies, possibilitando o diagnóstico e o reconhecimento de variantes intraespecíficas (CACCIÒ et al., 2002; THOMPSON, 2004).

#### 4.5. *Blastocystis* sp. (Alexeieff, 1911)

Alocado taxonomicamente no Reino Chromista, Filo Opalinata, Classe Blastocystea, Ordem Blastocystida, Família Blastocystidae. A classificação taxonômica desse parasito é motivo de controvérsias, ademais, este foi considerado o primeiro chromista a parasitar animais e humanos (CAVALIER-SMITH, 1998). Este gênero é composto pela espécie *B. hominis*, no entanto, estudos voltados a caracterização molecular, não demonstraram distinções morfológicas e sim uma grande variabilidade genética destes com os demais isolados de outros animais, que tornou claro a existência de linhagens genéticas (BÖHM-GLONING et al., 1997; CLARK, 1997). Assim, com o intuito de evitar redundâncias, a denominação foi limitada à *Blastocystis* sp. classificados em subtipos (STENSVOLD et al., 2007; PARIJA; JEREMIAH, 2013).

Em profissionais e pessoas que mantêm contato direto com animais infectados, inclusive de produção, a prevalência da infecção é significativamente maior em relação a população em geral (SALIM et al., 1999; STENSVOLD et al., 2009; PARKAR et al., 2017). Alguns estudos indicam que os suínos poderiam ser considerados o modelo animal apropriado para estudos de infecção experimental por *Blastocystis* sp. uma vez que estes animais apresentaram alta prevalência de ST5, sendo considerados hospedeiros naturais deste subtipo (WANG et al., 2014). Ademais, no Brasil, uma pesquisa demonstrou que além dos suínos e bovinos, os ovinos também apresentam frequência alta de animais positivos (MOURA et al., 2018).

Alexeieff em 1911 realizou o primeiro relato publicado de *Blastocystis* sp., após a observação destas células em amostras fecais de aves, sanguessugas, ratos e répteis. Estes são organismos unicelulares, estritamente anaeróbicos e consideravelmente polimórficos, atualmente, já foram descritas seis formas evolutivas, a vacuolar, granular, ameboide, multivacuolar, avacuolar e cística, cujos tamanhos variam entre 2 e 200  $\mu\text{m}$  e a função individual exercida por cada forma ainda não está bem elucidada (TAN, 2008; STENSVOLD et al., 2009; RENE et al., 2009). No entanto, sabe-se que a maioria das formas apresentam uma camada fibrilar externa de revestimento, na qual pode exercer a função de aderência, tanto da mucosa intestinal quanto para microrganismos utilizados para a nutrição do parasito, incluindo a proteção contra condições adversas no meio ambiente externo (DUNN et al., 1989; STENZEL; BOREHAM, 1996).

A forma vacuolar apresenta em média de 2 a 200  $\mu\text{m}$  sendo a mais evidenciada em fezes. A característica marcante deste estágio evolutivo, é a presença de um considerável vacúolo citoplasmático, que ocupa cerca de 90% do volume celular, aparentemente denso contendo

material amorfo, de função desconhecida. Nas bordas do citoplasma encontram-se organelas como múltiplas mitocôndrias-like, complexo de Golgi, endossomos, além de quatro núcleos (STENZEL; BOREHAM 1996; TAN et al., 2002). Este estágio também pode ser frequentemente observado em culturas, o que sugere que a forma vacuolar dê origem à granular em certas condições de cultivo, por meio da axenização do mesmo, do aumento da concentração de soro ou pela adição de antibióticos (DUNN et al., 1989).

A forma granular geralmente é menor em relação as vacuolares, com diâmetros de 3 a 80  $\mu\text{m}$  e ainda apresenta grânulos no interior do vacúolo (TAN, 2004; DUNN et al., 1989). Este estágio evolutivo é considerado um produto degenerativo devido o surgimento em culturas mais antigas e expostas ao estresse térmico (TAN, 2004; GAYTHRI et al., 2014). Assim, um experimento realizado com formas vacuolares demonstrou que após exposição à altas temperatura por um período de 24 h, o crescimento do parasito foi drasticamente reduzido e evoluído para granular e com a prosseguimento do cultivo foi retomado o crescimento alcançando o dobro da quantidade (THERGARAJAN et al., 2018).

A forma ameboide é a responsável pela adesão do parasito ao epitélio intestinal (TAN; SURESH, 2006; RAJAMANIKAM; GOVIND, 2013). Apresenta um formato irregular com inserção de pseudópodes e medem cerca de 2,6 a 7,8  $\mu\text{m}$ , comumente pode ser observada em fezes de hospedeiros sintomáticos e não aparentam ter motilidade (STENZEL; BOREHAM, 1996; VDOVENKO, 2000). Além disso, segundo os mesmos autores, esta forma também apresenta estruturas como um núcleo bem característico, organelas mitocôndrias irregulares, inclusões lipídicas e múltiplos vacúolos próximos aos pseudópodes.

As formas avacuolares e multivacuolares são menores (5 a 8  $\mu\text{m}$ ) e por vezes, não são descritas no ciclo biológico proposto por alguns autores (TAN, 2004). Estas são quase indistinguíveis e podem ter a possibilidade de serem formas intermediárias durante a transição entre a vacuolar e cística, ademais avacuolar é desprovida de cápsula e também pode ser encontrada em fezes frescas e são mais frequentes em meios de culturas, mas, a literatura dispõe de poucas informações sobre a transição exata entre um estágio morfológico a outro ao longo do ciclo evolutivo (TAN, 2008).

Inúmeras formas da reprodução dos *Blastocystis* sp. foram citadas, no entanto, a reprodução por fissão binária e esquizogonia são as mais aceitas atualmente. O ciclo biológico destes parasitos, têm início com a ingestão dos cistos, que somadas a ações do pH e enzimas intestinais, sofrem o desencistamento com a perda de sua camada fibrilar e a liberação das formas vacuolares na região do cólon. Estas podem originar novas formas vacuolares, granulares, avacuolares, ameboides, multivacuolares através da mitose. Então, as formas



multivacuolares se desenvolve em um pré-cisto que por meio da esquizogonia, concede origem a um cisto de parede fina responsável pela auto-infecção do hospedeiro. Enquanto a forma ameboide, também por esquizogonia, origina os cistos de parede espessa que são excretados em conjunto com as fezes (PARIJA; JEREMIAH, 2013). A reprodução sexuada é uma forma de reprodução proposta sem evidências convincentes na literatura (ZHANG et al., 2012).

Já foram descritos mais de 30 subtipos, que variam entre ST1-ST17; ST21; ST23-ST32 com possíveis subtipos novos encontrados, como ST18, ST19, ST20 e ST22 (ZHAO et al., 2017). Assim, ST1- ST9 parasitam animais e humanos, sendo ST1-ST4 prevalentes em humanos, ST1-ST5 comumente relatados em animais de fazenda como bovinos, suínos e caprinos (PARKAR et al., 2007, ALFELLANI et al., 2013) e, ST10-ST17 relatados em animais silvestres e provenientes de jardins zoológicos ( ALFELLANI et al., 2013; ROBERTS et al., 2013) Estudos ainda relatam infecções por ST12 em indivíduos que mantiveram contato com ovinos e lhamas, destacando grande potencial zoonótico e ainda possíveis casos de colonização mista (RAMIREZ et al., 2016).

Assim mundialmente este parasito é relatado em uma ampla gama de animais, bem como os de produção, primatas não humanos, aves, anfíbios, répteis, peixes, artrópodes e anelídeos (SANTÍN et al., 2011; ALFELLANI et al., 2013; YOSHIKAWA et al., 2016; VILLANUEVA-GARCIA et al., 2017; CIAN et al., 2017) e, no México, também já foi relatado em ostras (COMPEAN et al., 2018). No entanto, estes patógenos que mantêm interação com múltiplas espécies, tendem a exibir menor especificidade e diferente plasticidade. Desse modo, mesmo que detenham a capacidade de infectar diferentes hospedeiros, o nível de prevalência da infecção e as implicações epidemiológicas, mantêm relações com o processo de adaptação do parasito ao meio e em certas espécies hospedeiras, o que pode contribuir com uma melhor compreensão sobre suas fontes de infecção e rotas de transmissão (WESTRAM et al., 2011).

*Blastocystis* sp. são os organismos mais comumente isolados em pesquisas parasitológicas apesar de todas as controvérsias devido as divergências que surgem em relação sua patogenicidade e o comensalismo. O seu papel patogênico foi estabelecido primeiramente em pacientes infectados que apresentavam quadros de diarreia severa (DENG et al., 2021). Estes são considerados uns dos protozoários com maior prevalência entre as zoonoses intestinais, devido seu tamanho consideravelmente avantajado, superfície irregular e alta carga parasitária e também apontados como patógenos emergentes, oportunistas, com grande potencial invasivo (TAN et al., 2009; CLARK et al., 2013). Fato este demonstrado através da obstrução luminal do apêndice causada por *Blastocystis* sp. (LINTONG et al., 2012) e, por meio

de análises histopatológicas, que demonstrou a presença do mesmo em lesões com ulcerações na mucosa intestinal de um indivíduo infectado (JANARTHANAN et al., 2011).

Pesquisas apontaram uma associação entre a infecção por *Blastocystis* sp., ao câncer colorretal, indicando a possível influência deste parasito sobre o risco de desenvolvimento da doença devido a contribuição para o aumento do estresse oxidativo, fator relevante para o desenvolvimento da tumorigênese colorretal. (MOHAMED et al., 2017; SAYGILI et al., 2003). No Brasil, subtipo ST3 também foi encontrado em cisto esplênico de uma mulher jovem imunocompetente e além disso esses patógenos são capazes de induzir e modular a resposta imune do hospedeiro e apoptose dos enterócitos (LONG et al., 2001; WAWRZYNIAK et al., 2012; NOURRISSON et al., 2016).

Alguns autores buscam correlacionar a sintomatologia com os diferentes subtipos, porém, a blastocistose pode ser assintomática ou apresentar sinais clínicos inespecíficos. Ainda não há um esquema terapêutico específico para cada subtipo, pois cada um desenvolve uma susceptibilidade própria, no entanto, estudos *in vitro* demonstram que o parasito é sensível à alguns medicamentos como furazolidona, sulfametoxazol com trimetropim, pentamidina e iodoquinol, todavia sendo necessários mais estudos, mas, alguns já estão em desenvolvimento, como os testes de anticorpos séricos utilizando antígeno celular também foram desenvolvidos e demonstraram uma correlação entre a resposta de anticorpos no soro e a Blastocistose sintomática (HUSSAIN et al., 1997; MAHMOUD; SALEH, 2003).

#### **4.6. *Balantioides* spp. (Malmstein, 1857)**

Pertence ao Reino Protozoa, Filo Ciliophora, Subfilo Intramacronucleata, Classe Litostomatea, Subclasse Trichostomatia, Ordem Vestibuliferida e Família Balantidiidae (LYNN, 2010; ADL et al., 2019). Com base nessa classificação filogenética, estes protozoários ainda foram inseridos no Super Grupo Chromalveolata devido a presença de plastídios de endosimbiose secundária (ADL et al., 2019).

Malmstein foi o primeiro a detectá-lo em humanos com disenteria em 1857, como *Paramecium coli*, no entanto, *Balantidium* spp. foi sugerida por Claparède e Lachmann em 1858, através da observação destes parasitos no reto de rãs. Após esse período, Leuckart descreveu uma espécie morfológicamente semelhante no intestino de suínos e Stein percebeu que ambas, se tratava do mesmo protozoário, nomeando como *Balantidium coli*, em relação ao seu formato semelhante a um “saco” (GARCIA, 2008; SCHUSTER; ÁVILA, 2008) e, recentemente passou a ser aceito como *Balantioides coli*. (POMAJBÍKOVÁ et al., 2013).

Aproximadamente 50 espécies deste gênero foram descritas mediante diferenças morfológicas e hospedeiros infectados, no entanto, a existência de muitas espécies são contestadas, como *B. suis* (MC DONALD, 1922) e, *B. caviae* que parasitam porquinhos da Índia (NEIVA et al., 1914). Pois, estas e outras espécies descritas, apresentam apenas mínimas diferenças morfológicas entre os trofozoítos e são altamente similares a *B. coli*, sendo esse critério de diferenciação morfológico considerado sucinto e insuficiente (NILLES-BIJE; RIVERA, 2010). Ademais, *B. coli* exibe diferentes características de crescimento em diferentes meios de cultura e hospedeiros (LEVINE, 1961).

Estudos moleculares, foram realizados com o intuito de identificar a diversidade de espécies de *Balantioides* spp. e, para tanto, o RNA ribossômico (RNAr) e os genes 18s, 5.8s e 28s utilizados como alvo (PONCE-GORDO et al., 2008; BARBOSA et al., 2016). Assim, algumas sequências completas do gene da subunidade menor RNAr (SSU-RNAr) de *Balantioides* spp. disponíveis foram comparadas com os isolados de hospedeiros distintos, demonstrando uma sucinta variabilidade genética (NILLES-BIJE; RIVERA, 2010).

Demais pesquisas também analisaram diferenças genéticas contidas em isolados de humanos, suínos, avestruzes e gorilas, assim, através do método de sequenciando e comparação do gene 18s RNAr e ITS1 5.8s RNAr ITS2, foi confirmado a existência das variantes genéticas A e B, na região ITS e mais dois genes no RNAr micronuclear, evidenciando ainda cinco tipos destas variantes caracterizadas por (A0, A1, A2, B0 e B1), onde a variante A é considerada altamente zoonótica sendo encontrada em uma gama de hospedeiros, enquanto a B aparentemente não apresenta caráter zoonótico (PONCE-GORDO et al., 2011; BYUN et al., 2021). Outras pesquisas utilizando os marcadores SSDNAr e ITS1-5.8 SDNAr-ITS2, foi avaliada com o intuito de evidenciar a diversidade genética de *B. coli*, o que resultou com uma proposta para a introdução de um novo gênero, *Neobalantidium*, ordenar a espécie *B. coli* em conjunto com as demais variantes relatadas (POMAJBÍKOVÁ et al., 2013).

*Balantioides coli* é considerado o maior protozoário ciliado com distribuição cosmopolita e com grande potencial para infectar uma ampla gama de animais incluindo o homem e alguns invertebrados (AHMED et al., 2020; BIANCHI et al., 2019; ZHAO et al., 2020). Os suínos e javalis são considerados os principais hospedeiros e reservatórios, com uma frequência de 100% destes parasitos no rebanho. No entanto, a balantidíase, por vezes, é assintomática nos suínos, pois, o parasita comumente se nutre de compostos amiláceos, distribuídos de forma abundante no intestino destes animais (KAUR; GUPTA, 2016). Fato este que coopera com a alta transmissão destes protozoários em regiões rurais e agrárias onde é

comum a criação suína e os indivíduos tanto coexistem com estes animais quanto atuam como criadores (SCHUSTER; ÁVILA, 2008).

Assim, devido à sua natureza assintomática, por vezes este protozoário é negligenciado, sem grande importância para a saúde pública, no entanto, surgimento da sintomatologia, quando se trata de animais de produção e silvestres, infecções gastrointestinais, referentes a balantidíase, são comumente conhecidas por gerar perdas e baixo desempenho, reduzindo o tamanho do rebanho ou da ninhada além do nível de produtividade (YBAÑEZ, 2017). Ademais, a balantidíase também está envolvida tanto na redução significativa de eritrócitos e hemoglobina, quanto no aumento dos hematócrito em ovinos e caprinos afetados e, a possível razão para tais parâmetros nos níveis de eritrocíticos alterados, pode ter lesões patológicas e hemorragias intestinais graves, culminando com diarreia sanguinolenta (JAMIL; IJAZ, 2015).

*Balantioides coli* apresenta dois estágios evolutivos, os cistos são estruturas esféricas e ligeiramente ovais com em média 40 µm à 70 µm de diâmetro e apresentam uma parede protetora espessa de aspecto hialino, outras estruturas como o macronúcleo e vacúolos (OLIVEIRA et al., 2021; PONCE-GORDO; RODRÍGUEZ, 2021). Por vezes mesmo sob a forma cística são capazes de demonstrar sinais de movimentação, esta é considerada a forma infectante de alta resistência que pode permanecer viável no ambiente por em média duas semanas após excreção sob boas condições (AREÁN; KOPPISCH, 1956).

Os trofozoítos, são os estágios evolutivos que segundo um estudo realizado com macacos em cativeiro infectados, também podem ser infectantes (POMAJBÍKOVÁ et al., 2010). Estes apresentam em média 30 µm a 200 µm de comprimento, são ovoides, com estrias longitudinais e recobertos por cílios somáticos, que permitem a locomoção por meio de movimentos circulares (SCHUSTER; ÁVILA, 2008; FLETCHER et al., 2012). Em sua porção anterior localiza-se o aparato oral, onde situa-se o citóstoma recoberto por cílios orais, enquanto na posterior se encontra a estrutura secretora, o citopígio (NILLE-BIJE; RIVERA, 2010; PONCE-GORDO et al., 2011).

O citoplasma é revestido por uma camada delgada, que permite a manutenção do parasito, nele há um macronúcleo reniforme ao lado de um micronúcleo esférico, mitocôndria de dupla membrana, túbulos membranosos internos, o retículo endoplasmático em planos e extensos e alguns ribossomos livres (NILLE-BIJE; RIVERA, 2010). Além de estruturas como vacúolos contráteis que atuam na osmorregulação e vacúolos digestivos onde são encontradas bactérias, grãos de amido e glóbulos vermelhos ingeridos (NILLE-BIJE; RIVERA, 2010; DEVERA, 2018). Vale ressaltar, que os trofozoítos também podem ingerir outro *Balantioides* sp., ovos de *Trichuris* sp. e larvas de outras espécies de parasitos (ZAMAN, 1978).

Com a ingestão dos cistos, ocorre o desencistamento no intestino delgado e os trofozoítos liberados, colonizam o intestino grosso e apêndice, onde residem e realizam a replicação por fissão binária, realizando a reprodução assexuadamente e logo após a sexuada por conjugação, onde dois organismos se unem pelo citóstoma e realizam a conjugação por trocas genéticas. Os trofozoítos sofrem encistamento e produzem novos cistos infecciosos ou culminam por invadir a parede do cólon, onde se multiplicam, gerando quadros ulcerativos na parede do cólon e infecções extraintestinais. Alguns retornam ao lúmen e se encistam e os cistos maduros são eliminados com fezes (ANARGYROU et al., 2003; SCHUSTER; ÁVILA, 2008).

A balantidíase é responsável por uma taxa de mortalidade de 30% (ESTEBAN et al., 1998) sendo este parasito considerado, pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação um patógeno emergente que deve ser incluído em diretrizes específicas de controle. (BOUWKNEGT et al., 2018). Alguns tratamentos para redução dos casos incluem o secnidazol, a oxitetraciclina e o metronidazol, com eficácia variável contra a infecção em diversas espécies de animais domésticos (NÓBREGA; BRITTO, 2023)

#### **4.7. Diagnóstico parasitológico de protozoários**

O diagnóstico laboratorial de identificação dos protozoários, incluem técnicas como as coproparasitológicas, que tem por embasamento a detecção dos cistos e oocistos através do material fecal do hospedeiro, com base nos critérios morfológicos das principais formas evolutivas dos parasitos. Assim, a análise pode ser utilizada com fezes frescas ou conservadas, através do exame direto ou pelo emprego de técnicas de concentração. Estas técnicas ainda podem ser associadas a métodos de coloração temporária com a utilização do corante lugol ou por métodos de coloração permanente, como: tricromo de Masson, giemsa e hematoxilina férrica (CARLI, 1994; EYMAEL et al., 2010).

O cultivo de enteroprotzoários, envolve variáveis semelhantes ao pH do meio, a microbiota associada e diferenças entre cepas, incluindo as necessidades nutricionais intrínsecas. Existem três tipos de sistemas de cultivo acelular: xênico, onde o parasito cresce na presença de microrganismos desconhecidos, o monoxênico, que ocorre em conjunto um determinado microrganismo conhecido e o axênico, onde o parasito se desenvolve na ausência de células. No entanto, o diagnóstico de protozoários em meio de cultura é uma técnica restrita, além disso, o cultivo prolongado *in vitro*, atenua a virulência dos parasitos, sendo necessário novos testes (SCHUSTER; ÁVILA, 2008).

As técnicas de flutuação incluem o uso de soluções densas e permitem uma melhor concentração e purificação dos oocistos, dentre as demais, destaca-se a técnica de Sheather, a centrífugo-flutuação em solução de sacarose, na qual também pode ser utilizado demais técnicas com soluções de sulfato de zinco e solução de cloreto de sódio (AHMED; KARANIS, 2018). Os métodos baseados em microscopia são os mais comumente utilizados por serem menos onerosos e de fácil execução, no entanto, alguns métodos de diagnóstico como a microscopia de luz são dificultados devido ao pequeno tamanho de certos esporos do parasito (CUNHA et al., 2019).

O diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp., pode ocorrer através das técnicas de concentração por sedimentação e centrifugação simples ou sedimentação em solução de água - éter ou formalina – éter (AHMED; KARANIS, 2018; VANATHY et al., 2017). Estas técnicas antecedem os métodos de coloração permanente, como os ácidos resistentes aquecidos ou não, sendo a solução de safranina-azul de metileno a 1%, de Ziehl – Neelsen modificado e a de Kinyoun, que são comumente empregadas, para posterior observação do parasito em microscopia óptica (WEBER et al., 1991).

*Enterocytozoon bienersi*, apresenta esporos de tamanho reduzido, que dificulta os métodos de diagnóstico como a microscopia de luz, ademais, ‘kits’ comerciais para ensaio sorológico por vezes estão indisponíveis (SAK et al., 2010; WEBER et al., 1994). No entanto, para o diagnóstico de *Entamoeba* spp., a microscopia óptica apresenta sensibilidade limitada de aproximadamente 60% (ZLOBL, 2001), mas, outros métodos são sugeridos para a confirmação do protozoário, principalmente em casos de amebíase invasiva, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), hemaglutinação indireta, imunodifusão, teste de difusão em gel, imunofluorescência indireta (RIFI), imunoeletoforese e fixação do complemento (SAMIE et al., 2012).

No caso de *Giardia* spp. os métodos parasitológicos mais utilizados é o método de flutuação em sulfato de zinco a 33% (FAUST et al., 1939) que demonstra eficiência, praticidade e rapidez. A utilização de anticorpos monoclonais em técnicas de imunofluorescência direta e ensaio imunoenzimático (ELISA) também podem ser empregados, contudo, possuem valor epidemiológico limitado (O’HANDLEY, 2002).

No caso dos *Blastocystis* spp. o microscópio de contraste de fase por vezes auxilia na visualização de estruturas internas em ciliados corados ou fixados com Lugol, no entanto, este quando muito concentrado pode dificultar a visualização de demais estruturas internas. A biópsia do cólon, seguida da coloração por hematoxilina - eosina, é útil para avaliação os danos à parede intestinal (SCHUSTER; ÁVILA, 2008).

*Balantioides spp.* apresenta um considerável tamanho além de sua motilidade em espiral, que permite uma fácil identificação em preparações de lâminas de montagem úmida (40-100x). Métodos de concentração fecal podem ser usados, como sedimentação espontânea e sedimentação de acetato de formalina-etila e a coloração em Lugol com diluições de 1:5 a 1:100 (SCHUSTER; ÁVILA, 2008; PONCE-GORDO; RODRÍGUEZ, 2021).

A caracterização molecular dos protozoários é considerada uma das mais práticas mais recentes, de alta sensibilidade na qual é realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida do sequenciamento dos fragmentos amplificados, que determina a positividade do espécime a ser identificado (RINDER et al., 1998; MUNGTHIN et al., 2005; NAKAMURA et al., 2009). Esta técnica baseia-se na amplificação exponencial de um fragmento de ácido nucléico e é amplamente utilizada como uma ferramenta de diagnóstico que permite detecção e diferenciação em nível de espécie, genótipo e subgenótipo do patógeno (MORGAN et al., 1998; SANTÍN, 2015).

#### **4.8. Epidemiologia**

Nos plantéis nacionais infecções por parasitas gastrointestinais, sobretudo, protozoários, podem determinar sérios danos à saúde humana e dos animais em todas as fases da produção, sendo os animais mais jovens, os mais susceptíveis a contrair a infecção, principalmente os neonatos e aqueles em fase de lactação (CARREIRO et al., 2016). No entanto, os animais mais velhos mesmos após o desenvolvimento da imunidade adquirida, quando submetidos a certas condições adversas como estresse, doenças secundárias, comprometimento do sistema imune, incluindo carências nutricionais também se tornam predispostos a infecção (GONÇALVES et al., 2002).

Em geral, as parasitoses também são facilitadas pelas condições climáticas extremas e ambientes pouco higiênicos e transmitidas através do contato oro-fecal, com as fezes de animais e pessoas infectadas ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Além disso, a prática de sobrepastoreio e pisoteio constante em pastagens contendo dejetos fecais, incluindo a lavagem inadequada dos estábulos, a considerável aglomeração em áreas reduzidas, as descargas residuais em água de superfície e a falta de tratamento da água fornecida aos animais, são fatores que culminam com a permanência e cooperam com a disseminação dos parasitos no ambiente rural (JONES, 2005; SCHOENIAN, 2007; CUNHA, 2017).

Vale ressaltar, que os protozoários entéricos necessitam de outro ser vivo para sua sobrevivência e seu parasitismo ocorre por meio da interação com outros indivíduos, onde

estabelecem um contato profundo e contínuo a nível histológico, gerando um vínculo de dependência metabólica (REY, 2010). A persistência e a severidade da patogênese por parte destes parasitos ainda não estão completamente compreendidas, acredita-se que sejam multifatoriais, que podem ser influenciadas por aspectos como espécies dos parasitos, bem como a resistência a diversas adversidades ambientais, o número de formas infectantes excretados e ingeridos (dose infectante), a especificidade parasitária e o *status* imunológico do hospedeiro (O'DONOGHUE, 1995; DEL COCO et al., 2009).

A prevalência e a distribuição das espécies de enteroparasitos, varia entre uma região a outra e mantém relação com os diferentes sítios de infecção. No entanto, a grande maioria dos países em desenvolvimento com clima tropical e subtropical, são os mais predisponentes à uma variedade de infestações parasitárias. Pois, à alta temperatura, propicia a formação de locais úmidos e quentes, ideais para o desenvolvimento dos parasitos (CUNHA, 2017). Muitos autores relataram a ocorrência de uma maior taxa de liberação de oocistos em bovinos juvenis nas estações mais secas, ademais, estes países que atribuídos ao clima tropical, geralmente são afligidos por populações altamente vulneráveis em grandes desvantagens sociais, que residem em áreas rurais e periurbanas repleta de conflitos políticos e sociais, por vezes, isentas de infraestrutura institucionais, instalações de saneamento básico, do conhecimento e aplicabilidade das normas higiênico-sanitária necessárias, o que dificulta o controle e a erradicação dos parasitos (SCHMIDTE et al., 2000; RAMÍREZ et al., 2023; ALDEYARBI et al., 2016).

#### **4.9. Prevenção e profilaxia**

A água deve ser isenta de contaminantes químicos e patógenos de considerável potencial biológico, para tanto, esta deve ser submetida a práticas de análises anualmente a fim de assegurar sua qualidade (TULLY; SHANE, 1996). Os plantéis devem acomodar um número ideal de animais e as demais estruturas como bebedouros e comedouros presentes nos diversos sistemas de produção, devem ser frequentemente higienizados, incluindo a retirada de restos alimentares ao fim do dia, pois estas estruturas agem como potenciais fontes de contaminação, devido ao compartilhamento destas com muitos animais e que ainda podem estar contaminados por fezes favorecendo o surgimento das parasitoses (LIMA, 2004). Ademais, também deve ser administrado medicamentos antiparasitários e regulamentar o destino das fezes após a lavagem dos estábulos (JESUS; MULLER, 2000), visto que a destinação correta dos dejetos é de suma importância e atualmente vem sendo uma prática comumente empregada para geração de bioenergia (OLIVEIRA et al., 2018).



## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Local de execução do Projeto**

As fezes dos animais foram coletadas em 14 propriedades rurais nas cidades de Muriaé, Eugenópolis, Patrocínio do Muriaé e Barão de Monte Alto da Microrregião de Muriaé pertencente a Mesorregião da Zona da Mata Mineira, em Minas Gerais, divisa com o Rio de Janeiro. Nas propriedades que foram coletadas as fezes dos animais também foram coletadas as águas das propriedades utilizadas para consumo para posterior análise. O isolamento dos protozoários e o diagnóstico molecular foram realizados no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) do Laboratório de Sanidade Animal (LSA), pertencente ao Centro de Ciências e Pesquisas Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) localizado no Hospital Veterinário (HV/UENF).

### **5.2. Animais utilizados**

Foram coletadas no período de outubro de 2022 a junho de 2023, 288 amostras fecais de 100 bovinos, 74 ovinos, 51 caprinos e 63 suínos e a amostragem por conveniência e levando-se em consideração a disponibilidade de cada propriedade. Todas as amostras foram coletadas após a contenção dos animais em piquetes, diretamente da ampola retal com o auxílio de sacos plásticos, acondicionados em caixas isotérmicas a 4°C para transporte até o laboratório. As amostras foram processadas em até 24 horas, contadas a partir da coleta.

### **5.3. Isolamento dos protozoários a partir de amostras fecais**

Para concentração dos protozoários nas fezes dos animais foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação com solução hiper saturada de sacarose (FIUZA et al., 2008). Para isso, 15g de cada amostra de fezes foram transferidas para tubos cônicos de 50mL e, em seguida, adicionada uma quantidade suficiente de água destilada até alcançar um volume de 50mL. Os tubos foram deixados em repouso por 20 minutos e, após agitação, filtrados em malha de aço de 45µm de porosidade. Os filtrados foram transferidos para um novo tubo de 50mL, no qual também foi adicionada uma quantidade suficiente de água destilada até completar 50mL de volume final. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1190g, o sobrenadante descartado logo após. O sedimento foi então ressuspensionado em água destilada até alcançar um volume de 25mL, logo em seguida foram adicionados 25mL de solução de sacarose (1,1g/mL) e, depois de realizada a homogeneização da solução, os tubos foram novamente centrifugados a 1190g por 20 minutos à 4°C. Foram aspirados

4mL do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos de 15mL e adicionado 11mL de água destilada para que fosse obtido o volume final de 15mL em cada tubo. Esta solução foi centrifugada a 1190g por 10 minutos com o sobrenadante descartado logo em seguida e o sedimento então ressuspensionado em 500µL de água destilada, e transferido para um tubo Eppendorf e congelado para posterior extração do DNA.

#### **5.4. Filtragem e processamento das amostras de água**

Foram coletados 10 litros da água de consumo dos animais de todas as propriedades visitadas, provenientes da borda de diferentes fontes como açudes, nascentes, córregos e bebedouros que são fornecidas aos animais, além das utilizadas pelos residentes. As amostras foram armazenadas em galões de 5 litros de polipropileno previamente esterilizados e mantidos em caixa de isopor com gelo até a chegada ao laboratório. Para remoção do excesso de matéria orgânica como algas, plantas e outros contaminantes, uma pré-filtragem foi realizada sob vácuo usando papel de filtro qualitativo com 125 mm de porosidade. Posteriormente as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de acetato de celulose com 142 mm de diâmetro e tamanho de poro de 1,2 µm (Sartorius Co.) por meio de um dispositivo de vácuo. Para a recuperação dos protozoários, o filtro foi lavado três vezes com solução salina tamponada com fosfato a 0,1% (PBS) e Tween 80 a 0,1%. As soluções de lavagem foram colocadas em tubos cônicos estéreis de 50mL e centrifugados a 3000g por 10min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento submetido a flutuação de sacarose (HAMDY et al., 2019; CAPO et al., 2019). Foram aspirados 4mL do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos de 15mL, onde foi adicionado 11mL de água destilada para que seja obtido o volume final de 15mL em cada tubo. Esta solução foi centrifugada a 1190g por 10 minutos com o sobrenadante descartado logo em seguida e o sedimento então ressuspensionado em 500µL de água destilada e transferido para um tubo Eppendorf e congelado para posterior extração do DNA. Todo equipamento de filtração foi esterilizado com hipoclorito de sódio a 5% e água MilliQ antes e entre cada filtração.

#### **5.5. Diagnóstico Molecular**

##### **5.5.1. Extração do DNA**

Foi utilizado o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) com reagentes fornecidos pela própria empresa com ligeiras modificações no protocolo (SANTÍN et al., 2004). Após descongelamento das amostras, 80µL foram misturadas a 180µL de tampão ATL e completamente homogeneizadas em vortex. Após esta etapa, foram adicionados 20µL de proteinase K (20mg/mL) e, novamente a mistura foi homogeneizada. Os tubos foram incubados overnight a 55°C e foram então adicionados 200µL

de tampão AL e o protocolo restante seguido de acordo com as orientações do fabricante, com apenas uma exceção: para aquisição da quantidade de DNA recuperado, o ácido nucléico foi eluído em 50µL de tampão AE.

### 5.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amostras foram examinadas pela PCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* spp., *Balantidium* sp., com iniciadores específicos em termociclador Eppendorf® Mastercycler® Personal.

#### 5.5.2.1. *Cryptosporidium* spp.

Foi utilizado o protocolo de nested PCR, com amplificação em duas etapas de um fragmento de 830 pb do gene 18S rRNA. Para amplificação primária, foi utilizado os seguintes iniciadores: CRYPTOOF (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') e CRYPTOR (5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'); e para a amplificação secundária: AL1598 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') e AL3032 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'). O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes para a amplificação primária: tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (3mM); dNTP (0,2mM), Taq (2,5U) (Qbiogene®); BSA (2,5µL-0,1g/10mL); 1µM de cada um dos iniciadores e 1µL de DNA, em um volume final de 25µL. A amplificação secundária conteve tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTP (0,2mM); Taq (2,5U), BSA (2,5µL-0,1g/10mL); 1µM de cada um dos iniciadores e 1µL do produto da primeira reação, em um volume final de 25µL. Para a amplificação primária foi realizado os seguintes ciclos no termociclador: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/45s, 59°C/45s e 72°C/1 min; e um último ciclo de 72°C/7 min. Para a amplificação secundária: 94°C/3 min; 40 ciclos de 94°C/30s, 58°C/90s e 72°C/2 min; e um último ciclo de 72°C/7 min (XIAO et al., 1999).

#### 5.5.2.2. *Enterocytozoon* sp.

As reações primárias e secundárias da PCR foram realizadas com um conjunto de iniciadores específicos para *Enterocytozoon* sp., que amplificam a região ITS dos genes da subunidade ribossomal RNA: EBITS3 (5'-GGTCATAGGGATGAAGAG-3') e EBITS4 (5'-TTCGAGTTCTTTCGCGCTC-3') como os iniciadores externos, e EBITS1 (5'-GCTCTGAATATCTATGGCT-3') e EBITS2.4 (5'-ATCGCCGACGGATCCAAGTG-3') como os iniciadores internos. Os componentes e concentrações utilizados na primeira reação de amplificação foram os seguintes: MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); KCl (50mM); Tris-HCl (pH 9 - 20mM); dNTP (0,2mM); Taq (2,5 U); BSA (2,5µL - 0,1g/10ml) e iniciadores (EBITS3 e EBITS4) na concentração de 50pmol cada,

em um volume final de 25µL. Após uma desnaturação inicial à 94°C/3 min, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de amplificação a 94°C/30s, 57°C/30s e 72°C/40s, seguidos de uma extensão final de 72°C/10 min. As condições para a PCR secundária foram idênticas às da primeira reação, com exceção da utilização dos iniciadores EBITS1 e EBITS2.4 e de utilização de 30 ciclos de amplificação, com temperatura de anelamento de 55°C. Assim, as reações produziram fragmentos de 435 e 390pb (BUCKHOLT et al., 2002).

#### 5.5.2.3. *Entamoeba* spp.

Foram utilizados os iniciadores específicos para *Entamoeba* spp. ENTAM1 (5'-GTTGATCCTGCCAGTATTATATG-3') e ENTAM2 (5'-CACTATTGGAGCTGGAATTAC-3') que amplificam fragmentos de 550pb em uma única reação de amplificação. O procedimento de amplificação foi realizado em um volume de reação de 25 µL contendo 0,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega®, USA) e 10,5 µL de água e 1 µL de DNA. Para a amplificação foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min e 72 °C/1 min e uma extensão final de 72 °C/7 min (SUKPRASERT et al., 2008).

#### 5.5.2.4. *Giardia* spp.

Foi utilizado o protocolo de nested PCR, com amplificação em duas etapas de um fragmento de 300 pb do gene 18S rRNA. Para amplificação primária foram utilizados os seguintes iniciadores: GiaF (5'-AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3') e GiaR (5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3') e para amplificação secundária: RH11(5'-CATCCGGTTCGATCCTGCC-3') e RH4(5'-AGTCGAACCCTEATTCTCCGCCAGG-3'). Para a primeira reação de amplificação foram utilizados, em um volume final de 25 µL: tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); Dntp (0,2Mm); Taq (2U); Dimetilsulfóxido (DMSO) (2,5 µL) e 0,5 µL de cada um dos iniciadores. A amplificação secundária possui os mesmos reagentes e concentrações que a primeira reação. Para a amplificação primária foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 96° C/2 min; um total de 35 ciclos, cada um, consistindo de 96° C/45s, 58°C/30s e 72°C/45s e uma extensão final de 72°C/4 min. Para amplificação secundária: 96°C/2 min; 35 ciclos de 96°C/45s, 55°C/30s e 72°C/45s e uma extensão final de 72° C/4 min. (APPELBEE et al.,2003; HOPKINS et al., 1997).

#### 5.5.2.5. *Blastocystis* sp.

Foi amplificado o gene SSU rDNA de *Blastocystis* de aproximadamente 550pb: BF (5'-

GGAGGTAGTGACATAAATC-3') e BR (5'-TGCTTTTCGCACTTGTTTCATC-3'). A reação de PCR é realizada utilizando um volume final de 25 µL e cada reação conteve 10 mM de TrisHCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, iniciadores (10 pmol µl) 1,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,05% de albumina de soro bovino (BSA) e 1 µL de amostra de DNA alvo. As etapas do ciclo foram compostas por um passo inicial de desnaturação inicial a 95°C/5 min, seguido por 35 ciclos a 95°C/30s, 54°C/30s e 72°C/2 min, além da etapa de extensão final a 72°C/7 min (SANTÍN et al., 2011).

#### 5.5.2.6. *Balantioides* spp.

A região ITS1–5.8s - rRNA – ITS2 de *Balantioides* foi amplificada usando os iniciadores B5F (5'-GCTCCTACCGATAACCGGGT-3') e B5R (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'). A PCR foi realizada em um volume de reação de 25 µL, contendo 0,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega®, USA) e 10,5 µL de água e 1 µL de DNA. O ciclo que amplificou um produto de aproximadamente 550pb consistência de desnaturação inicial de 94°C/5 min, seguida por 30 ciclos de 94°C, 60°C e 72°C, cada um por 1 min e extensão final a 72°C/5 min (PONCE-GORDO et al., 2008).

### 5.6. Eletroforese em gel de agarose

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1% ou 2% e visualizado após coloração com GelRed® (Biotium, EUA). No mesmo gel, foi carregado o marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®), além dos controles positivos já existentes no laboratório e controle negativo. Os produtos amplificados foram visualizados na fotodocumentadora (Gel Logic 200 Imaging System, EUA) e software Carestream Molecular Imaging após a corrida eletroforética.

### 5.7. Estatística

Utilizando o software Excel, foram efetivados cálculos da média de infecção por espécie animal e cidades e da região analisadas, além das análises das frequências, levando-se em consideração o quantitativo de amostras positivas para cada um dos microrganismos investigados nas fezes e fontes de água, em relação as propriedades e os hospedeiros investigados. Para verificar associação entre as variáveis estudadas em relação a cada microrganismos, hospedeiros e ao potencial de contaminação da água de consumo animal e humana foram calculados o risco relativo (Rr) utilizando o software MedCalc, disponível em [https://www.medcalc.org/calc/relative\\_risk.php](https://www.medcalc.org/calc/relative_risk.php). e a razão de chance “odds ratio” (OR) através

de programa I.C. Calculator. Disponível em:  
<https://www2.ccrb.cuhk.edu.hk/stat/confidence%20interval/CI%20for%20ratio.htm>.

## 6. RESULTADOS

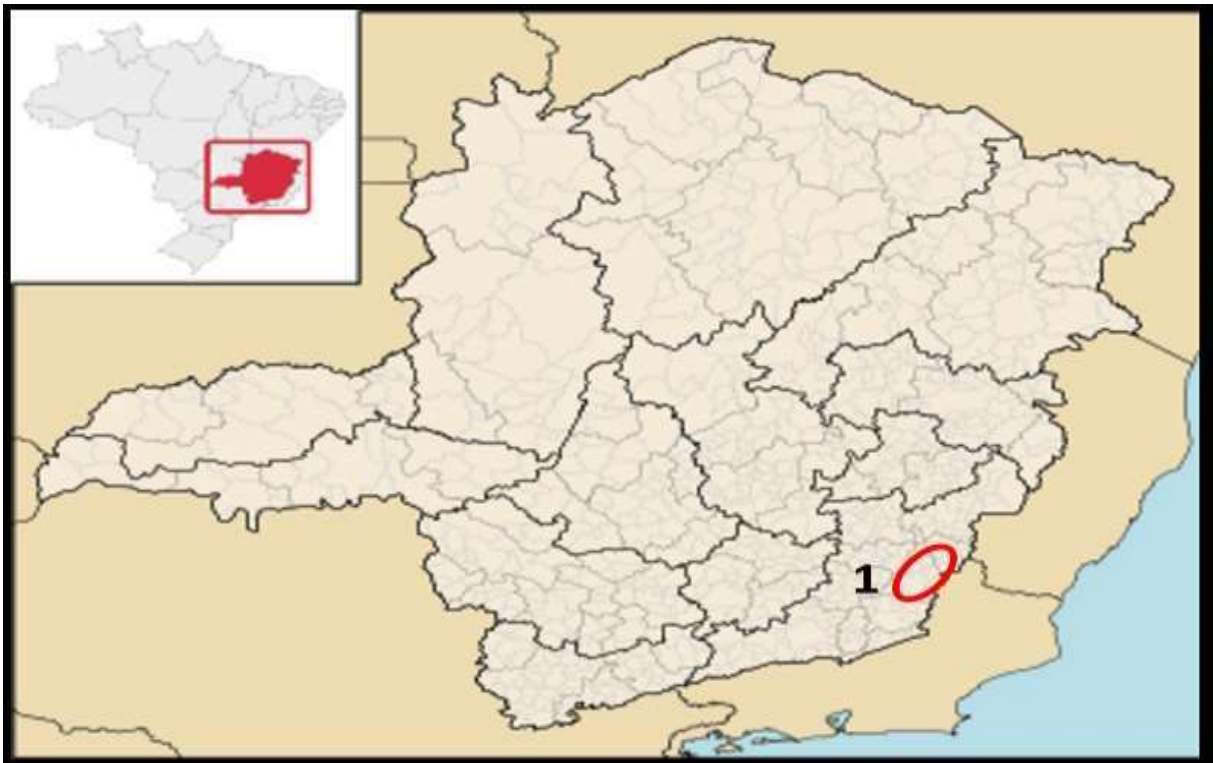
Foram coletadas 288 amostras de fezes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos de ambos os sexos e idades variadas, além de água de consumo dos animais e residentes das propriedades nos municípios de Muriaé, Eugenópolis, Barão de Monte Alto e Patrocínio do Muriaé na Mesorregião da Zona da Mata Mineira, Microrregião de Muriaé, divisa com o Estado do Rio de Janeiro (Figura 1).

Dentre as cidades onde se coletou as amostras desta pesquisa não foram coletadas amostras de fezes de caprinos e suínos no município de Muriaé, da mesma forma não foram coletadas amostras de fezes de bovinos em Patrocínio de Muriaé, caprinos em Barão de Monte alto e ovinos em Eugenópolis (Tabela 2).

Dos 288 animais pesquisados para a presença de protozoários pela PCR (Figura 2) em suas fezes as frequências foram de 1%, 16%, 54%, 43%, 27% e 16% para *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* sp. e *Balantioides* spp., respectivamente (Tabela 1). O protozoário mais frequente foi *Giardia* spp. e não se observou parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em ovinos, caprinos e suínos (Tabela 1), além disso nas fezes de bovino a frequência deste protozoário, foi baixa 3% (Tabela 1). Outro parasita não diagnosticado foi *Balantioides* spp. em fezes de ovinos e caprinos, no entanto, sua presença nas fezes dos suínos foi significativa 67% (Tabela 1). *Entamoeba* spp., *Enterocytozoon* sp. e *Blastocystis* sp., foram outros parasitas presentes em fezes de todas as espécies animais investigados, inclusive com frequências elevadas (Tabela 1).

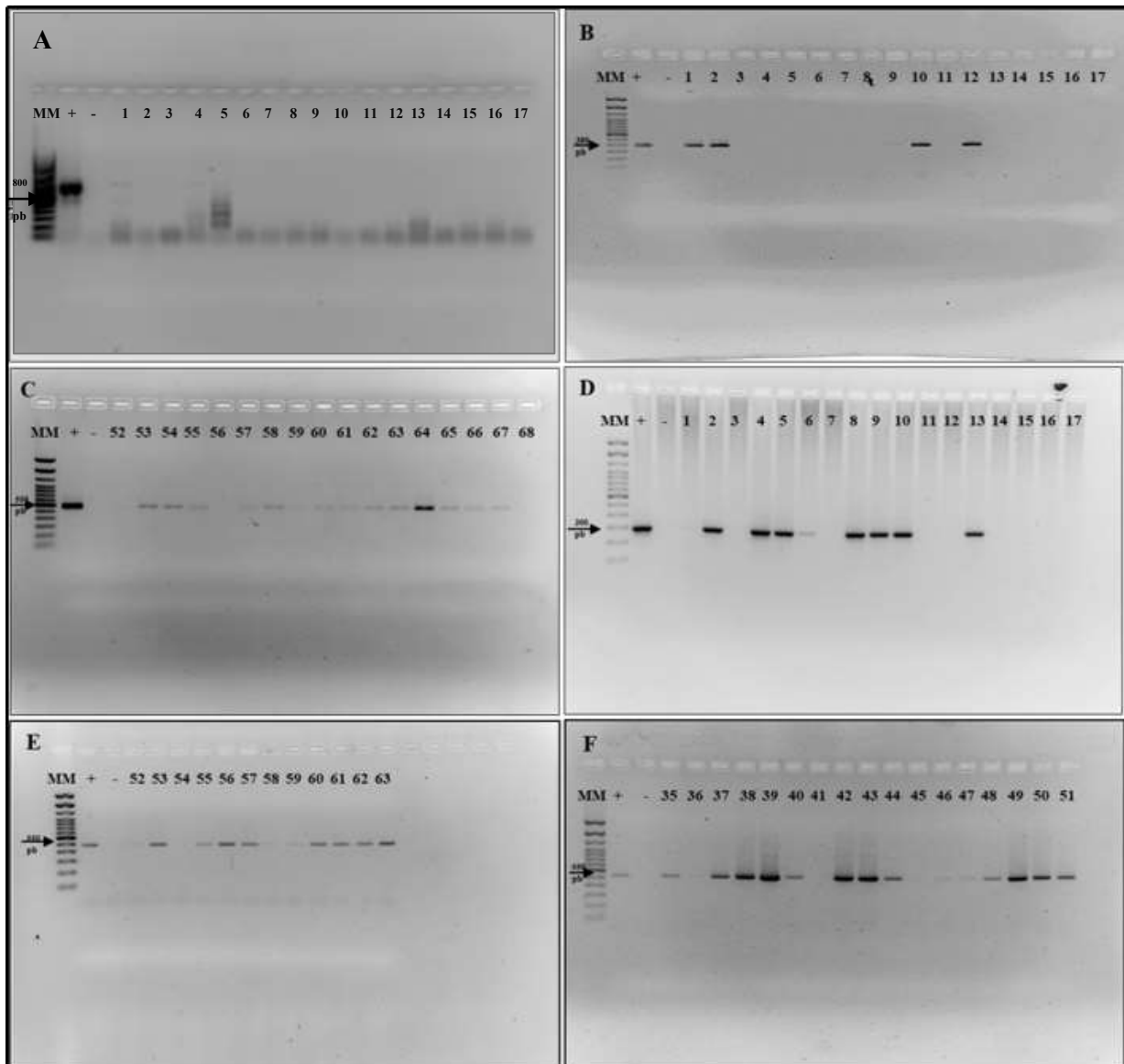
Exceto *Cryptosporidium* spp. que só foi evidenciado em bovinos nas cidades de Eugenópolis e Barão de Monte Alto, os demais protozoários de importância em saúde pública foram evidenciados em praticamente todas as espécies de animais de produção com uma ampla distribuição entre os municípios de coleta das amostras (Tabela 2). No entanto verificou-se uma baixa frequência de *Enterocytozoon* sp. e *Giardia* spp. em bovinos e suínos, respectivamente em todos os municípios. Também foi verificada frequências elevadas de *Entamoeba* spp. em bovinos: 70%, suínos: 71% e de *Giardia* spp. em ovinos: 57% e caprinos: 76%, nos municípios onde se pesquisou a presença destes protozoários (Tabela 2).

*Blastocystis* sp. esteve presente em todos os municípios com os bovinos, apresentando frequência alta desta parasitose em todos os municípios onde se coletou as amostras de fezes desta espécie animal. Foram observadas frequências importantes deste parasita em ovinos em Barão de Monte Alto, em caprino em Eugenópolis e em suínos em Patrocínio do Muriaé (Tabela 2).



**Figura 1.** Em 1 Região da Mata Mineira onde se localizam os municípios de coleta: Muriaé, Eugenópolis, Barão de Monte Alto e Patrocínio do Muriaé. Representando os locais de coleta de fezes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos e água de consumo dos animais e residentes, utilizadas para o diagnóstico molecular de protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp., *Giardia* spp., *Blastocystis* sp. e *Balantoides* spp.), importantes em saúde única.





**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose identificando os amplificados do DNA genômico de protozoários de importância em Saúde Única em fezes de animais de produção. Em **A** amostras de fezes de bovinos (1 a 17) demonstrando positividade para *Cryptosporidium* spp. em 1 e 4, onde se evidenciou bandas de 800 pb. Em **B** amostras de fezes de ovinos (1 a 17), onde as amostras 1, 2, 10 e 12 foram consideradas positivas para *Enterocytozoon* sp. (seta mostra bandas 390 pb). Em **C** diagnóstico de *Entamoeba* spp. em amostras de fezes de ovinos (52 à 68), onde não se evidenciou bandas de 550 pb (seta) em três amostras 52, 56 e 59, consideradas negativas. Em **D** bandas bem evidentes de 300 pb (seta), demonstrando positividade para *Giardia* spp. em amostras de fezes de caprinos (1 a 17). Em **E** amostras (52 a 63), com oito bandas de 550 pb (seta), evidenciando a presença de *Blastocystis* sp. em fezes de suínos. Em **F** 12 amostras positivas pela banda de 550 pb (seta) em 17 examinadas (35 a 51), evidenciando a presença de *Balantoides* spp. em fezes de suínos.

**Tabela 1:** Frequência de protozoários de importância em Saúde Única através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em fezes animais de produção.

ANIMAIS	n <sup>1</sup>	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)											
		<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Enterocytozoon</i> sp.		<i>Entamoeba</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.		<i>Blastocystis</i> sp.		<i>Balantioides</i> spp.	
		Positivos	Frequência	Positivos	Frequência	Positivos	Frequência	Positivos	Frequência	Positivos	Frequência	Positivos	Frequência
Bovinos	100	3	3%	8	8%	70	70%	35	35%	37	37%	3	3%
Ovinos	74	0	0%	18	24%	22	30%	42	57%	11	15%	0	0%
Caprinos	51	0	0%	11	22%	19	37%	39	76%	16	31%	0	0%
Suínos	63	0	0%	8	13%	45	71%	9	14%	15	24%	42	67%
<b>TOTAL</b>	<b>288</b>	<b>3</b>	<b>1%</b>	<b>45</b>	<b>16%</b>	<b>156</b>	<b>54%</b>	<b>125</b>	<b>43%</b>	<b>79</b>	<b>27%</b>	<b>45</b>	<b>16%</b>

**Tabela 2:** Frequência de protozoários de importância em Saúde Única, verificada através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em fezes animais de produção em relação localização (cidades) onde se encontram as propriedades de coletadas as amostras.

ANIMAL	Cidades	n	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)											
			<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Enterocytozoon</i> sp.		<i>Entamoeba</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.		<i>Blastocystis</i> sp.		<i>Balantioides</i> spp.	
			PS <sup>2</sup>	FR <sup>3</sup>	PS	FR	PS	FR	PS	FR	PS	FR	PS	FR
<b>BOVINO</b>														
	Muriaé	41	0	0%	4	4%	29	29%	17	17%	12	12%	1	1%
	Eugenópolis	25	2	2%	4	4%	17	17%	1	1%	11	11%	2	2%
	Patrocínio do Muriaé	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Barão de Monte Alto	34	1	1%	0	0%	24	24%	17	17%	14	14%	0	0%
	<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>3%</b>	<b>8</b>	<b>8%</b>	<b>70</b>	<b>70%</b>	<b>35</b>	<b>35%</b>	<b>37</b>	<b>37%</b>	<b>3</b>	<b>3%</b>
<b>OVINO</b>														
	Muriaé	31	0	0%	8	11%	2	3%	10	14%	3	4%	0	0%
	Eugenópolis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Patrocínio do Muriaé	20	0	0%	9	12%	4	5%	9	12%	0	0%	0	0%
	Barão de Monte Alto	23	0	0%	1	1%	16	22%	23	31%	8	11%	0	0%
	<b>TOTAL</b>	<b>74</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>18</b>	<b>24%</b>	<b>22</b>	<b>30%</b>	<b>42</b>	<b>57%</b>	<b>11</b>	<b>15%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>CAPRINO</b>														
	Muriaé	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Eugenópolis	31	0	0%	7	14%	4	8%	22	43%	16	31%	0	0%
	Patrocínio do Muriaé	20	0	0%	4	8%	15	29%	17	33%	0	0%	0	0%
	Barão de Monte Alto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>TOTAL</b>	<b>51</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>11</b>	<b>22%</b>	<b>19</b>	<b>37%</b>	<b>39</b>	<b>76%</b>	<b>16</b>	<b>31%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>SUÍNO</b>														
	Muriaé	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Eugenópolis	20	0	0%	6	10%	9	14%	3	5%	3	5%	8	13%
	Patrocínio do Muriaé	18	0	0%	0	0%	16	25%	3	5%	10	16%	10	16%
	Barão de Monte Alto	25	0	0%	2	3%	20	32%	3	5%	2	3%	24	38%
	<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>8</b>	<b>13%</b>	<b>45</b>	<b>71%</b>	<b>9</b>	<b>14%</b>	<b>15</b>	<b>24%</b>	<b>42</b>	<b>67%</b>
	<b>TOTAL GERAL</b>	<b>288</b>	<b>3</b>	<b>1%</b>	<b>45</b>	<b>16%</b>	<b>156</b>	<b>54%</b>	<b>125</b>	<b>43%</b>	<b>79</b>	<b>27%</b>	<b>45</b>	<b>16%</b>

<sup>1</sup>Número amostral.

<sup>2</sup>Reação positiva na amplificação do DNA genômico pela PCR.

<sup>3</sup>Frequência da reação positiva na amplificação do DNA genômico pela PCR.

Na análise molecular da água de consumo dos animais e residentes das propriedades onde se coletou as amostras de fezes, verificou-se uma baixa presença do DNA genômico dos protozoários analisados, inclusive não foram observados casos positivos de *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* sp.. Na água de consumo dos animais foram observadas frequências de 7%, 13% e 47 % para *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp. e *Balantioides* spp., respectivamente e, *Giardia* spp. não foi observado na água de consumo dos animais, no entanto, este protozoário teve frequência (57%) elevada na água de consumo dos residentes (Tabela 3).

Na análise da magnitude da associação entre as frequências diagnosticadas dos protozoários nas fezes dos animais pela PCR e o sexo, aptidão e manejo, estimou-se o risco relativo (Rr), indicando quantas vezes a ocorrência da frequência nos animais positivos para o protozoário foi maior que a frequência dos animais negativos. Para as análises em que foram evidenciados Rr, foram também calculados a razão de chance “odds ratio” (OR). *Cryptosporidium* spp. foi somente diagnosticado em bovinos (Tabela 4) e o sexo não foi fator determinante para a infecção  $P=0,6608$  [Rr= 0,5195 (IC 95%: 0,0279-9,6843) ]. O sexo em relação a infecção por *Enterocytozoon* sp. não teve significância (Tabela 5) para bovinos, ovinos, caprinos e suínos.

Quanto ao Rr para a infecção por *Entamoeba* spp. (Tabela 6), somente suínos não apresentaram fatores de risco em relação ao sexo  $P=1,0000$  [Rr= 1,0000(IC95%: 0,5427-1,8425)]. As fêmeas de bovinos correm 1,3 mais risco de contraírem a infecção que machos (Tabela 6) e apresentaram três vezes mais chances de diagnóstico do protozoário em suas fezes OR=3,11 (IC95%:0,8425-11,5196). Machos de ovinos correm 2,5 mais riscos de se infectarem com *Entamoeba* spp. que as fêmeas desta espécie (Tabela 6)  $P=0,0086$  [Rr=2,5000(IC95%:1,2619-4,9528)] e apresentam seis vezes mais chances de diagnóstico de *Entamoeba* spp. em suas fezes que as fêmeas OR=6 (IC95%:5,9999-6,0001). Caprinos fêmeas correm 0,25 vezes mais risco de infecção que os machos (Tabela 6)  $P=0,0472$  [Rr=0,2574 (IC95%:0,06774-0,9833)] e apresentam 0,15 mais chances de diagnóstico do parasitismo em suas fezes OR=0,15 (IC95%:0,0298-0,7667).

Em nenhuma das espécies, bovinos, ovinos, caprinos e suínos foram observados Rr quanto ao sexo em relação a infecção de *Giardia* spp.,  $P=0,1478$ ,  $P=0,4759$ ,  $P=1,1549$  e  $P=0,1759$ , respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 3:** Frequência de protozoários de importância em Saúde Única através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em águas de consumo de animais e população residente em propriedades rurais.

PROTOZOÁRIO	ÁGUA DE CONSUMO					
	ANIMAIS			RESIDENTES		
	n	Positivo	Frequência	n	Positivo	Frequência
<i>Cryptosporidium</i> spp.	15	0	0%	14	0	0%
<i>Enterocytozoon</i> sp.	15	1	7%	14	0	0%
<i>Entamoeba</i> spp.	15	2	13%	14	0	0%
<i>Giardia</i> spp.	15	0	0%	14	8	57%
<i>Blastocystis</i> sp.	15	0	0%	14	0	0%
<i>Balantioides</i> spp.	15	7	47%	14	0	0%
TOTAL	15	10	67%	14	8	57%

**Tabela 4:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Cryptosporidium* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Macho	0 (0%)	21 (21%)	21 (21%)	0,6608	0,5195	0,0279
	Fêmea	3 (3%)	76 (76%)	79 (79%)			à
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			<b>9,6843</b>
Ovinos	Macho	0 (0%)	24 (32%)	24(32%)	0,7195	2,0400	0,0417
	Fêmea	0 (0%)	50 (68%)	50 (68%)			à
	<b>Total</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>74 (100%)</b>	<b>74 (100%)</b>			<b>99,8463</b>
Caprinos	Macho	0 (0%)	16 (31%)	16 (31%)	0,7045	2,1176	0,0444
	Fêmea	0 (0%)	35 (69%)	35 (69%)			à
	<b>Total</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>51 (100%)</b>	<b>51 (100%)</b>			<b>102,223</b>
Suínos	Macho	0 (0%)	28 (44%)	28 (44%)	0,9132	1,2414	0,0254
	Fêmea	0 (0%)	35 (56%)	35 (56%)			à
	<b>Total</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>63 (100%)</b>	<b>63 (100%)</b>			<b>60,6789</b>

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 5:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Enterocytozoon* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Macho	2 (2%)	19 (19%)	21 (21%)	0,7351	1,3016	0,2827 à 5,9921
	Fêmea	6 (6%)	73 (73%)	79 (79%)			
	<b>Total</b>	<b>8 (8%)</b>	<b>92 (92%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Macho	6 (8%)	18 (24%)	24 (32%)	0,9251	1,0417	0,4450 à 2,4386
	Fêmea	12 (16%)	38 (51%)	50 (68%)			
	<b>Total</b>	<b>18 (24%)</b>	<b>56 (76%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Macho	5 (10%)	11 (22%)	16 (31%)	0,2527	1,8229	0,6515 à 5,1007
	Fêmea	6 (12%)	29 (57%)	35 (69%)			
	<b>Total</b>	<b>11 (22%)</b>	<b>40(78%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Macho	1 (2%)	27 (43%)	28 (45%)	0,0971	0,1786	0,0233 à 1,3672
	Fêmea	7 (11%)	28 (44%)	35 (55%)			
	<b>Total</b>	<b>8 (13%)</b>	<b>55 (87%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 6:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Entamoeba* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Macho	18 (18%)	3 (3%)	21 (21%)	0,0284	1,3022	1,0284 à 1,6490
	Fêmea	52 (52%)	27 (27%)	79 (79%)			
	<b>Total</b>	<b>70 (70%)</b>	<b>30 (30%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Macho	12 (16%)	12 (16%)	24 (32%)	0,0086	2,5000	1,2619 à 4,9528
	Fêmea	10 (14%)	40 (54%)	50 (68%)			
	<b>Total</b>	<b>22 (30%)</b>	<b>52 (70%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Macho	2 (4%)	14 (27%)	16 (31%)	0,0472	0,2574	0,0674 à 0,9833
	Fêmea	17 (33%)	18 (36%)	35 (69%)			
	<b>Total</b>	<b>19 (37%)</b>	<b>32(63%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Macho	20 (31%)	8 (13%)	28 (44%)	1,0000	1,0000	0,5427 à 1,8425
	Fêmea	25 (40%)	10 (16%)	35 (56%)			
	<b>Total</b>	<b>45 (71%)</b>	<b>18 (29%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da P.olimerase (PCR).

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%..



**Tabela 7:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Giardia* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Macho	10 (10%)	11 (11%)	21 (21%)	0,1478	1,5048	0,8652 à 2,6170
	Fêmea	25 (25%)	54 (54%)	79 (79%)			
	<b>Total</b>	<b>35 (35%)</b>	<b>65 (65%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Macho	15 (21%)	9 (12%)	24 (33%)	0,4759	1,1574	0,7744 à 1,7299
	Fêmea	27 (36%)	23 (31%)	50 (67%)			
	<b>Total</b>	<b>42 (57%)</b>	<b>32 (43%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Macho	14 (27%)	2 (4%)	16 (31%)	0,1549	1,2250	0,9262 à 1,6203
	Fêmea	25 (49%)	10 (20%)	35 (69%)			
	<b>Total</b>	<b>39 (76%)</b>	<b>12 (24%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Macho	2 (3%)	26 (41%)	28 (44%)	0,1759	0,3571	0,0804 à 1,5860
	Fêmea	7 (11%)	28 (45%)	35 (56%)			
	<b>Total</b>	<b>9 (14%)</b>	<b>54 (86%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR).

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

*Blastocystis* sp. também foi um dos protozoários presente nas fezes dos principais animais pecuários pesquisados neste trabalho (Tabela 1). Foram verificadas expressivas diferenças na frequência de *Blastocystis* sp. em animais machos e fêmeas, no entanto esta variação não foi suficiente para determinar risco relativo quanto à variável sexo dos bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Com o valor de P dos suínos muito próximo de 0,05 (Tabela 8), foi calculado o Rr e OR e verificou-se que os machos apresentam 2,5 mais risco de infecção que as fêmeas  $P=0,05$  [Rr=2,5 (IC95%:0,9653-6,4745)] e que estes têm 3 vezes mais chances de diagnóstico do protozoários em suas fezes que as fêmeas  $OR=3,333$ (IC95%:0,9819-11,3161). Apenas bovinos e suínos apresentaram animais diagnosticados pela PCR por *Balantioides* spp. em suas fezes, no entanto, não foram verificados fatores de risco quanto ao parasitismo em relação ao sexo dos animais  $P=0,0926$  e  $P=0,4690$ , respectivamente (Tabela 9).

Quanto à aptidão todos os ovinos e suínos desta pesquisa eram destinados a produção de carne e foi observado bovinos e caprinos destinados ao abate (produção de carne) e aptidão mista, ou seja, destinados a produção leiteira, mas que poderiam ser abatidos de acordo com a necessidade do criador. Desta forma o Rr foi apenas avaliado em bovinos e caprinos, no entanto, não foram observados caprinos positivos na PCR para *Cryptosporidium* spp. e em apenas três bovinos de aptidão leiteira foi considerado positivo e, neste caso não foi observado Rr ( $P=0,3416$ ) quanto a aptidão destes animais (Tabela 10). *Enterocytozoon* sp. foi diagnosticado tanto em bovinos quanto em caprinos, mas a aptidão em relação a este protozoário não determinou Rr a infecção  $P=0,1086$  e  $P=0,6313$ , respectivamente (Tabela 11). Foi observado que bovinos de aptidão leiteira apresentam estatisticamente duas vezes mais riscos de infecção por *Entamoeba* spp. que os de aptidão mista  $P=0,0002$  [Rr=2,1534 (IC95%:1,4414-3,2172)], ou seja, os bovinos leiteiros têm 10 vezes mais chances de infecção  $OR=10,0833$ (IC95%:3,7455-27,1454) que os de aptidão mista (Tabela 12). Em caprinos ocorreu diferença estatística entre os animais de aptidão leiteira e mista, mas neste caso, como Rr foi menor que 0,1 a aptidão leiteira parece ser um fator protetor  $P=0,0003$ [Rr=0,1720 (IC95%:0,0666-0,4444)], no entanto, as chances de ocorrer a infecção nos animais de aptidão mista são baixas  $OR=0,0494$ (IC95%: 0,0115-0,2123), ou seja, nesta pesquisa os caprinos de aptidão mista têm 0,05 vezes maior chance de infecção que caprinos leiteiros. Embora não observado Rr quanto a aptidão dos bovinos e caprinos para a infecção por *Giardia* spp.  $P=0,0752$  e  $P=0,2240$ , respectivamente, foi observado uma quase significância quanto a aptidão para a presença do DNA de *Giardia* spp. em bovinos (Tabela 13). Foi calculado o OR para verificar a o quanto maior seria a chance infecção dos bovinos leiteiros frente aos de aptidão mista e esta foi insignificante  $OR=0,4206$  (IC:95%:0,0973-0,218).

**Tabela 8:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Blastocystis* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Macho	8 (8%)	13 (13%)	21 (21%)	0,9663	1,0378	0,5597 à 1,9240
	Fêmea	29 (29%)	50 (50%)	79 (79%)			
	<b>Total</b>	<b>37 (37%)</b>	<b>63 (63%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Macho	2 (3%)	22 (30%)	24 (33%)	0,2988	0,4630	0,1083 à 1,9793
	Fêmea	9 (12%)	41 (55%)	50 (67%)			
	<b>Total</b>	<b>11 (15%)</b>	<b>63 (85%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Macho	4 (8%)	12 (24%)	16 (32%)	0,5211	0,7292	0,2277 9 à 1,9134
	Fêmea	12 (23%)	23 (45%)	35 (68%)			
	<b>Total</b>	<b>16 (31%)</b>	<b>35 (69%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Macho	10 (16%)	18 (28%)	28 (44%)	0,0591	2,5000	0,9653 à 6,4745
	Fêmea	5 (8%)	30 (48%)	35 (56%)			
	<b>Total</b>	<b>15 (24%)</b>	<b>48 (76%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 9:** Risco relativo ao sexo levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Balantioides* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovino	Macho	2 (2%)	19 (19%)	21 (21%)	0,0926	7,5238	0,7163 à 79,0315
	Fêmea	1 (1%)	78 (78%)	79 (79%)			
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovino	Macho	0 (0%)	24 (32%)	24 (32%)	0,7195	2,0400	0,0417 à 99,8463
	Fêmea	0 (0%)	50 (68%)	50 (50%)			
	<b>Total</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>74 (100%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprino	Macho	0 (0%)	16 (31%)	16 (31%)	0,7045	2,1176	0,0438 à 102,2723
	Fêmea	0 (0%)	35 (69%)	35 (69%)			
	<b>Total</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>51 (100%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suíno	Macho	20 (32%)	8 (13%)	28 (44%)	0,4690	1,1364	0,8040 à 1,6062
	Fêmea	22 (35%)	13 (21%)	35 (56%)			
	<b>Total</b>	<b>42 (67%)</b>	<b>21 (33%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 10:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de *Cryptosporidium* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Leiteira	3 (3%)	60 (60%)	63 (63%)	0,3416	4,1563	0,2206 à 78,299
	Mista	0 (0%)	37 (37%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 11:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de *Enterocytozoon* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Leiteira	8 (8%)	55 (55%)	63 (63%)	0,1086	10,094	0,5993 à 169,99
	Mista	0 (0%)	37 (37%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>8 (8%)</b>	<b>92 (55%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Caprinos	Leiteira	6 (12%)	25 (49%)	31 (61%)	0,6313	0,7742	0,2722 à 2,2019
	Mista	5 (10%)	15 (29%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>11 (22%)</b>	<b>40 (78%)</b>	<b>51 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR).

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 12:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de *Entamoeba* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Leiteira	55(55%)	8 (8%)	63 (63%)	0,0002	2,1534	1,4414 à 3,2172
	Mista	15 (15%)	22 (22%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>70 (70%)</b>	<b>30 (30%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Caprinos	Leiteira	4 (8%)	27 (53%)	31 (61%)	0,0003	0,1720	0,0666 à 0,4444
	Mista	15 (29%)	5 (10%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>19 (37%)</b>	<b>32(63%)</b>	<b>51 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 13:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de amplificações do DNA genômico de *Giardia* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Leiteira	18 (18%)	45 (45%)	63 (63%)	0,0756	0,6218	0,3682 à 1,0502
	Mista	17 (17%)	20 (20%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>35 (35%)</b>	<b>65 (65%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Caprinos	Leiteira	22 (43%)	9 (18%)	31 (61%)	0,2240	0,8349	0,6242 à 1,1167
	Mista	17 (33%)	3 (6%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>39 (76%)</b>	<b>12 (24%)</b>	<b>51 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

Dos 100 bovinos avaliados quanto ao Rr da aptidão leiteira ou mista em relação ao isolamento do DNA de *Blastocystis* sp. nas fezes, não se observou risco  $P=0,3154$  (Tabela 14), do mesmo modo que também não se observou para *Balantioides* spp.  $P= 0,3416$  (Tabela 15). Em caprinos de aptidão mista não foram observados animais positivos para o encontro do DNA do parasita nas fezes (Tabela 14) em 20 amostras examinadas, no entanto, 31 amostras de caprinos leiteiros o DNA foi isolado de 16 caracterizando que os caprinos leiteiros são 21 vezes mais susceptíveis ao parasitismo de *Blastocystis* sp.  $P=0,0289$  [Rr = 21,656 (IC95%:1,3718-341,88280)], além disso, foi caracterizado que caprinos leiteiros têm 13 vezes mais chances de infecção que os de aptidão mista  $OR=12,7397$ (IC95%:0,00018-0,00036).

**Tabela 14:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Blastocystis* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>	
	Positiva	Negativa	Total				
Bovinos	Leiteira	21 (21%)	42 (42%)	63 (63%)	0,3154	0,7708	0,4637 à 1,2813
	Mista	16 (16%)	21 (21%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>37 (37%)</b>	<b>63 (63%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Caprinos	Leiteira	16 (31%)	15 (30%)	31 (61%)	0,0289	0,0289	1,3718 à 341,88
	Mista	0 (0%)	20 (39%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>16 (31%)</b>	<b>35 (69%)</b>	<b>51 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 15:** Risco relativo à aptidão levando-se em consideração a frequência de ampliações do DNA genômico de *Balantioides* spp. em fezes de bovinos de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com o estado do Rio de Janeiro.

Animal	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Leiteira	3 (3%)	60 (60%)	63 (63%)	0,3416	4,1563	0,2206 à 78,299
	Mista	0 (0%)	37 (37%)	37 (37%)			
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

Em relação ao manejo somente foram observados semi-intensivos e extensivos e o isolamento do DNA de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bovinos sob manejos semi-intensivo ou extensivo não foram determinantes  $P=0,3630$ , para risco da infecção por este protozoário (Tabela 16). O manejo relacionado a presença do DNA de *Enterocytozoon* sp. nas fezes de bovinos, ovinos e caprinos não apresentam significâncias ao risco de infecções a este protozoário  $P=0,0910$ ,  $P=0,5788$ ,  $P=0,6313$ , respectivamente (Tabela 17). No entanto o manejo semi-intensivo em suínos parece ocorrer mais infecção, ou seja, os suínos criados de forma semi-intensiva correm 1,5 mais riscos de se infectarem que os criados de forma extensiva  $P<0,0001$  [Rr=1,4865 (IC95%: 1,2362-1,7874)] e devido a não se observar suínos positivos criados extensivamente (Tabela 17), o cálculo OR determinou que as chances de os suínos criados de forma semi-intensiva são infinitamente maiores que os criados de forma extensivas (OR= $\infty$ ). Caprinos criados de forma semi-intensiva correm menos riscos que os criados de forma extensiva quanto a apresentarem *Entamoeba* spp. em suas fezes (Tabela 18), onde o sistema semi-intensivo parece ser um fator protetor a infecção por este protozoário  $P=0,0003$  [Rr=0,1720 (IC95%: 0,0660-0,4444)], no entanto, as chances dos caprinos criados nos sistemas extensivos insignificantes maior de se infectarem que os criados no sistema extensivo OR=0,04938(IC95%: 0,01149-0,21231). Nesta mesma tabela o manejo extensivo é que parece ser fator protetor à presença da *Entamoeba* spp. nas fezes de suínos que o sistema de criação semi-intensiva  $P=0,0203$  [Rr=0,7250 (IC95%:0,5526-0,9513)] e observou-se que os suínos criados de forma semi-intensiva têm 0,22 vezes mais chances de infecção que os criados extensivamente OR=0,2265(IC95%:0,04613-1,11286) de infecção pelo protozoário. Na tabela



18 pode ser observado também que os manejos semi-intensivo ou extensivo não influenciam na infecção por *Entamoeba* spp. em criações de bovinos e ovinos  $P=0,0964$  e  $P=0,5427$ , respectivamente. O tipo de manejo se semi-intensivo ou extensivo não foram determinantes no encontro do DNA de *Giardia* spp. nas fezes de bovinos, ovinos e caprinos  $P=0,6711$ ,  $P=0,2810$  e  $P=0,2240$ , respectivamente (Tabela 19), no entanto, o sistema intensivo de criação parece ser um fator de proteção a infecção por *Giardia* spp.  $P=0,0133$  [ $Rr=0,2000$ (IC95%: 0,0560-0,7147)], onde os animais criados no sistema extensivo correm maior chance de infecção este protozoário  $OR=0,4286$  (IC95%: 0,03102-0,65789).

**Tabela 16:** Risco relativo em relação a manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Cryptosporidium* spp. em fezes de bovinos de propriedades localizadas na região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Semi-intensivo	1 (1%)	59 (59%)	60 (60%)	0,3630	0,3333	0,0313 à 3,5548
	extensivo	2 (2%)	38 (38%)	40 (40%)			
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 17:** Risco relativo em relação a manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Enterocytozoon* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Semi-intensivo	0 (0%)	40 (40%)	40 (40%)	0,0910	0,0875	0,0052 à 1,4751
	extensivo	8 (8%)	52 (52%)	60 (60%)			
	<b>Total</b>	8 (8%)	92 (55%)	100 (100%)			
Ovinos	Semi-intensivo	7 (9%)	26 (36%)	33 (45%)	0,5788	0,7906	0,3450 à 1,821
	extensivo	11 (15%)	30 (40%)	41 (55%)			
	<b>Total</b>	18 (24%)	56 (76%)	74 (100%)			
Caprinos	Semi-intensivo	6 (12%)	25 (49%)	31 (61%)	0,6313	0,7742	0,2722 à 2,2019
	extensivo	5 (10%)	15 (29%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	11 (22%)	40 (78%)	51 (100%)			
Suínos	Semi-intensivo	8 (13%)	37 (58%)	45 (71%)	<0,0001	1,4865	1,2362 à 1,7874
	extensivo	0 (0%)	18 (29%)	18 (29%)			
	<b>Total</b>	8 (13%)	55 (87%)	63 (100%)			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 18:** Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Entamoeba* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Semi-intensivo	46 (46%)	14 (14%)	60 (60%)	0,0964	1,2778	0,9571 à 1,7052
	extensivo	24 (24%)	16 (16%)	40 (40%)			
	<b>Total</b>	<b>70 (70%)</b>	<b>30 (30%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Semi-intensivo	11 (15%)	22 (30%)	33 (45%)	0,5427	1,2424	0,6177 à 2,4990
	extensivo	11 (15%)	30 (40%)	41 (55%)			
	<b>Total</b>	<b>22 (30%)</b>	<b>52 (70%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Semi-intensivo	4 (8%)	27 (53%)	31 (61%)	0,0003	0,1720	0,0660 à 0,4444
	extensivo	15 (29%)	5 (10%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>19 (37%)</b>	<b>32 (63%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Semi-intensivo	29 (46%)	16 (25%)	45 (71%)	0,0203	0,7250	0,5526 à 0,9513
	extensivo	16 (25%)	2 (4%)	18 (29%)			
	<b>Total</b>	<b>45 (71%)</b>	<b>18 (29%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 19:** Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Giardia* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Semi-intensivo	22 (22%)	38 (38%)	60 (60%)	0,6711	1,1282	0,6465 à 1,9689
	extensivo	13 (13%)	27 (27%)	40 (40%)			
	<b>Total</b>	<b>35 (35%)</b>	<b>65 (65%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Semi-intensivo	21 (29%)	12 (16%)	33 (45%)	0,2810	1,2424	0,8373 à 1,8436
	extensivo	21 (28%)	20 (27%)	41 (55%)			
	<b>Total</b>	<b>42 (57%)</b>	<b>32 (43%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Semi-intensivo	22 (43%)	9 (18%)	31 (61%)	0,2240	0,8349	0,6242 à 1,1167
	extensivo	17 (33%)	3 (6%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>39 (76%)</b>	<b>12 (24%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Semi-intensivo	3 (4%)	42 (67%)	45 (71%)	0,0133	0,2000	0,0560 à 0,7147
	extensivo	6 (10%)	12 (19%)	18 (29%)			
	<b>Total</b>	<b>9 (14%)</b>	<b>54 (86%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (Nested PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

Caprinos e suínos criados em sistema semi-intensivo e extensivo correm mais riscos de parasitismo por *Blastocystis* spp. respectivamente (Tabela 20). Caprinos criados semi-intensivamente correm 21 vezes mais riscos de ter o protozoário em suas fezes que os criados no sistema extensivo  $P=0,0289$  [ $R_r=21,6563$  (IC95%:1,3718-341,8828)] e a chance de infecção por este protozoário é infinitamente maior  $OR=\infty$ . O sistema semi-intensivo em criações de suínos parece ser um fator de proteção para a presença *Blastocystis* sp. em suas fezes  $P=0,0001$  [ $R_r=0,0615$ (IC95%:0,0031-0,3228)] no entanto, esse fator de proteção, não é consideravelmente forte, tal como as chances de os animais criados no sistema extensivo ter 0,01 maior de chance de infecção, embora significativa  $OR=0,01789$ (IC95%:0,0031-0,10328). Não foram isolados o DNA de *Balantioides* spp. em relação ao manejo de ovinos e caprinos, não sendo possível a avaliação do  $R_r$  em relação ao sistema de criação destes animais e foi observado que o sistema semi-intensivo ou extensivo não determina  $R_r$  a criação de bovinos e suínos  $P=0,1178$  e  $P=0,2857$ , respectivamente (Tabela 21).

Em relação aos demais animais observados, os bovinos foram os únicos animais que apresentaram infecção por todos os protozoários analisados. Assim, 40% estavam infectados por um gênero de protozoários, 37% demonstraram infecção mista por dois gêneros distintos de parasitos, 9% demonstraram infecção por três gêneros distintos, 4% destes albergavam quatro gêneros distintos descritos nesta pesquisa e apenas 10% destes não apresentaram nenhuma infecção por quaisquer parasitos analisados na presente pesquisa. Os suínos, mantiveram uma frequência de 20% para aqueles infectados com apenas um gênero, 42% para aqueles que continham infecção mista com dois gêneros, 21% apresentavam três, 5% foram relatados com infecção mista por quatro gêneros distintos e, 12% dos suínos não apresentavam infecção por nenhum dos protozoários analisados. Vale ressaltar, que os suínos desta pesquisa, apesar de não apresentarem infecção por *Cryptosporidium* spp. foram detentores de uma média superior de infecção mista, em relação aos bovinos, enquanto a maioria dos pequenos ruminantes demonstraram infecção por apenas um ou dois gêneros de protozoários.

**Tabela 20:** Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Blastocystis* sp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovinos	Semi-intensivo	21 (21%)	42 (42%)	60 (60%)	0,3154	0,4708	0,4637 à 1,2813
	extensivo	16 (16%)	21 (21%)	40 (40%)			
	<b>Total</b>	<b>37 (37%)</b>	<b>63 (63%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Ovinos	Semi-intensivo	5 (7%)	28 (38%)	33 (45%)	0,9504	1,0354	0,3465 à 3,0941
	extensivo	6 (8%)	35 (47%)	41 (55%)			
	<b>Total</b>	<b>11 (15%)</b>	<b>63 (85%)</b>	<b>74 (100%)</b>			
Caprinos	Semi-intensivo	16 (31%)	15 (30%)	31 (61%)	0,0289	21,656	1,3718 à 341,88
	extensivo	0 (0%)	20 (39%)	20 (39%)			
	<b>Total</b>	<b>16 (31%)</b>	<b>35 (69%)</b>	<b>51 (100%)</b>			
Suínos	Semi-intensivo	2 (3%)	43 (68%)	45 (71%)	0,0001	0,0615	0,0154 à 0,2458
	extensivo	13 (21%)	5 (8%)	18 (29%)			
	<b>Total</b>	<b>15 (24%)</b>	<b>48 (76%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 21:** Risco relativo em relação ao manejo das propriedades levando-se em consideração a frequência de amplificação do DNA genômico de *Balantioides* spp. em fezes de animais de produção de propriedades localizadas na Região da Mata Mineira (MG), divisa com estado do Rio de Janeiro.

Animais	Problema	AMOSTRAS <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>	Rr <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>
		Positiva	Negativa	Total			
Bovino	Semi-intensivo	0 (0%)	60 (60%)	60 (60%)	0,1178	0,0960	0,0051 a 1,8103
	extensivo	3 (3%)	37 (37%)	40 (40%)			
	<b>Total</b>	<b>3 (3%)</b>	<b>97 (97%)</b>	<b>100 (100%)</b>			
Suínos	Semi-intensivo	32 (51%)	13 (20%)	45 (71%)	0,2857	1,2800	0,8435 a 2,0139
	extensivo	10 (16%)	8 (13%)	18 (29%)			
	<b>Total</b>	<b>42 (67%)</b>	<b>21 (33%)</b>	<b>63 (100%)</b>			

<sup>a</sup> Resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

<sup>b</sup> Valor de P.

<sup>c</sup> Risco Relativo.

<sup>d</sup> Intervalo de confiança de 95%.

## 7. DISCUSSÃO

Conforme Brasil (2009), a agricultura familiar, ocupa não mais que 24% das áreas agrícolas brasileiras, no entanto, representam aproximadamente 84% das propriedades rurais, sendo as grandes responsáveis pela produção de alimentos básicos, como a carne e o leite, que chega a atingir 58% do total produzido pelo país. Assim, as propriedades da Região da Mata Mineira, local designado para a presente pesquisa (Figura 1), é composta por diversas propriedades que albergam inúmeros agricultores familiares subsistentes e coopera com crescimento pecuário em áreas não tradicionais. Fato este constatado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE (2006), que demonstrou que os sistemas de criação destas propriedades representam uma das atividades econômicas mais relevantes para região, sendo grande parte destes gerenciados por propriedades familiares que assegura a permanência de um considerável número de produtores, eximindo-se o êxodo rural. No entanto, a grande maioria destes produtores por se concentrarem em áreas periurbanas, por vezes permanecem isentos de informações necessárias acerca dos manejos produtivos e sanitários. Para Ajibo et al (2020) às más condições de saneamento básico impostas nos plantéis, culmina com um perfil de produção irregular comumente relatado em países subdesenvolvidos, que Segundo Barbosa et al (2015 a) é altamente afetado pelas parasitoses.

Por esse motivo, o presente estudo analisou as fezes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos, de propriedades rurais da Messorregião da Zona da Mata mineira, por serem potencialmente consideradas um importante reservatório de protozoários e há poucos estudos científicos que relacione os níveis de infecção entre as propriedades desta região. Ademais, também foi de suma importância a análise da água utilizada para consumo de animais e residentes, visto que, há muitos registros de doenças associadas a parasitoses de veiculação hídrica de origem animal que afetam humanos, o que foi evidenciado por Ahmed et al (2019) e constatado em nossa pesquisa onde observou-se *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp. e *Balantioides* spp. na água consumida pelos animais e *Giardia* spp. na água de consumo humano (Tabela 2). Outros autores como Doran e Linn (1979), também relatam que a contaminação das águas superficiais e subterrâneas ocorre por meio do pisoteio constante e através do carreamento do material fecal por meio da lavagem inadequada dos estábulos e por ações de águas pluviais, no entanto, ainda são poucas as pesquisas que averiguem a qualidade da água fornecida no ambiente rural.



A quantidade de água coletada, 10 litros foram suficientes para realizar a técnica de filtração e retenção dos oocistos e cistos no filtro de fibra de vidro visto a eficiência na amplificação do DNA pela PCR desta pesquisa (Figura 2). Mayer e Palmer (1996) utilizando apenas um litro de amostras de água oriundas de tratamento de esgoto observaram que esta quantidade foi suficiente para diagnóstico molecular de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e que esta técnica mostra-se melhor que as técnicas de microscopia e uma correlação de 100% com a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Enquanto em relação ao total de efetivo de animais utilizados, o número de bovinos foi relativamente maior, pois, na Região da Mata Mineira a prática da bovinocultura prevalece de modo majoritário. Fato que pode ser observado por meio de uma pesquisa realizada pelo IBGE (2013), demonstrando que Minas Gerais apresenta um dos maiores rebanhos de bovinos com aptidão leiteira do Brasil, produzindo em média mais de seis bilhões de litros, equivalente a 30% da produção nacional, ademais, a Zona da Mata Mineira, também é responsável por essa alta taxa de criação, ocupando o 3º lugar no *ranking* de produção de leite no estado. Isto mostra a importância dos bovinos na epidemiologia de protozoários de importância em saúde única uma vez que esta espécie além de ser a de maior relevância para região, os bovinos apresentaram positividade para todas as espécies de protozoários alvo desta pesquisa (Tabela 1).

Os parasitos como *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon* sp., *Entamoeba* spp. *Giardia* spp., *Blastocystis* sp. e *Balantoides* spp., possuem uma ampla gama de hospedeiros o que pode ser observado na constatação da frequência observada na presente pesquisa onde todos as espécies tiveram pelo menos um protozoário frequente em suas fezes (Tabela 1), ressalta-se a importância destas parasitoses a grande diversidade de reservatórios além das fezes e *habitats* aquáticos. Ademais, seus cistos e oocistos além do alto potencial zoonótico, são dotados de alta capacidade de disseminação pelo ambiente (LODI et al., 2022).

Nakamura e Meireles (2015) reportam *Cryptosporidium* spp. como parasitos que apresentam uma ampla diversidade de hospedeiros em todo mundo. Os resultados negativos, estabelecidos de modo majoritário, principalmente entre ovinos, caprinos e suínos, além das fontes de água utilizadas, pode ser explicado devido à baixa frequência destes protozoários nesta região ou ainda por diferentes fatores. Paul *et al* (2014), relatam que os pequenos ruminantes também podem ser considerados reservatórios de diferentes espécies de *Cryptosporidium* spp., como a espécie *C. hominis* e *C. bovis*, que mantém uma considerável relação com a espécie bovina, no entanto isto não foi observado em nossa pesquisa na frequência observada em pequenos ruminantes (Tabela 1). Assim, segundo os mesmos autores, as taxas de infecção por estes parasitos são mais comumente relatadas, em animais na fase de

desmame, principalmente quando estes compartilham o mesmo ambiente com os bovinos, talvez isto explique a baixa frequência, visto que, tanto os caprinos quanto os ovinos utilizados nesta pesquisa, pertenciam a propriedades isentas de bovinos. Ademais, a negatividade da água pode ser explicada através dos estudos de Fricker e Cralb (1998), no qual evidenciaram que diversos fatores podem influenciar em taxas reduzidas, como clima, incidência solar etc., destacando-se a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp., que é baseada quase que de modo exclusivo, no tamanho da partícula, mas que na presente pesquisa, este fator não influenciou nos resultados visto a capacidade de retenção dos oocistos pelo filtro de fibra de vidro que retém partículas até 1,2 µm. A frequência de *Cryptosporidium* spp. (3%) em bovinos (Tabela 1), não foi suficiente para determinar risco de infecção em relação a aptidão (Tabela 10), no entanto, na República Tcheca um estudo realizado em propriedades de criação com aptidão leiteiras obteve uma frequência de infecções de 1,4 a 56,5% em bezerros pré-desmamado (KVÁC et al., 2006), assim os autores inferiram que os animais adultos, incluindo aqueles destinados a aptidão leiteira, podem estar servindo de reservatório do parasita mantendo frequências variadas nos bezerros dentro da criação. Observa-se também que até mesmo em animais amamentando as frequências observadas em nossa pesquisa se mantiveram dentro dos resultados e do intervalo da frequência observada por Kvac et al (2006), para bezerros de propriedades de aptidão leiteira. Thompson et al (2007) relatou casos que alcançaram 100% de positividade, um índice demasiadamente maior em relação aos resultados da nossa pesquisa, no entanto, a grande maioria das literaturas voltadas ao diagnóstico e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., relatam índices de positividade que variam de 0,6 a 82,54% com uma frequência média mundial de 21,62% (SILVA JÚNIOR et al., 2011). Brook et al (2008) sugerem que bezerros com até 21 dias são considerados importantes grupos que agem como potenciais reservatórios, responsáveis pelas altas frequências e eliminação de *Cryptosporidium* spp.. Ainda segundo Santín et al (2004), os bovinos podem agir como reservatório comuns de quatro espécies deste gênero, como *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*, entretanto, a prevalência das mesmas é bastante variada. Assim, vale ressaltar que em nossa pesquisa os bovinos na grande maioria eram adultos sem contato direto com animais lactentes o que pode justificar tais resultados.

O primeiro estudo realizado no Brasil envolvendo índices de infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos foi conduzido por Modolo et al (1988) que após a coleta de fezes de bezerros juvenis, foi observado que aqueles com menos de 30 dias de vida, apresentaram uma frequência de 26% de positividade, enquanto para os demais com mais de um mês, o índice de positividade reduziu para 23%. Vale ressaltar que a maioria dos bovinos

utilizados na presente pesquisa foram fêmeas com aptidão leiteira criadas em sistemas semi-intensivo, no entanto, a frequência de isolamentos de *Cryptosporidium* spp., pela PCR em nossa pesquisa não foi suficiente para determinar risco de infecção (Tabela 16), onde grande parte das amostras foram oriundas de animais adultos, o que pode ter contribuído com o alto índice de negatividade, pois, os que detiveram resultado positivo eram mantidos sob sistema extensivo e semi-intensivo e podem ter sido infectados mediante o contato com os demais animais mais jovens no recinto ou a pasto. Ramirez et al (2002), em seu trabalho sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. em vacas mestiças com aptidão mista, constatou-se que muitos destes animais são assintomáticos e, por vezes permanecem com um quadro subclínico da infecção, ou seja, eliminam os oocistos de modo intermitente ou de forma contínua, sendo os bovinos adultos uma fonte de infecção para os bezerros neonatos assim como, para contaminação ambiental. Assim, como sugerido por Scorza et al (2003) a baixa frequência de *Cryptosporidium* spp. nas fezes dos animais pode ocorrer devido uma distribuição desigual de oocistos em toda amostra fazendo com que a alíquota pipetada para PCR não contenha oocistos ou tenha um número muito baixo para ser detectado.

Ainda de acordo com o autor acima citado, as causas da escassez de resultados positivos, também podem ser oriundos de falhas relacionadas a ruptura dos oocistos durante a extração do DNA, que bloqueia sua liberação para a análise. Além disso, em muitos casos há uma absorção do DNA por compostos presentes nas fezes, além da presença de inibidores da PCR, que dificultam a aplicação deste método em materiais fecais. Outro fator crucial que pode ter contribuído para esse baixo percentual de oocistos nas fezes, inclui a lavagem constante das fezes durante a execução do método de Sheather, na qual, pode ocasionar a perda dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em vista disso, alguns pesquisadores como Huber et al (2003), propôs realizar certas mudanças nesta técnica, como alteração do tempo de centrifugação e da densidade da solução de sacarose de modo a amplificar a quantidade de DNA extraído do material melhorando a capacidade de amplificação e visualização pela eletroforese em gel de agarose (Figura 2).

Levando-se em consideração todas as amostras coletadas de todos os animais *Enterocytozoon* sp. foi mais frequente (16%), comparado ao *Cryptosporidium* spp. 1% (Tabela 1). Em bovinos por exemplo, a frequência deste protozoário foi de 8%, inferior em relação aos demais 24%, 22%, 13% para ovinos, caprinos e suínos, respectivamente (Tabela 1), além disso, a grande maioria dos infectados foram bovinos neonatos, no entanto a frequência de *Enterocytozoon* sp. em relação ao sexo não foi determinante para infecção (Tabela 5). Estas em sua maioria eram de aptidão leiteira, mantidas sob sistema semi-intensivo e nem a aptidão ou

sistema de criação foram determinantes ao risco de infecção (Tabela 11 e 17), embora os estudos realizados por Fiuza et al (2016), demonstrarem uma maior positividade entre bovinos de aptidão leiteira, mantidos sob os sistemas extensivo e intensivos. Ademais, há diversos outros estudos que também determinam uma frequência a nível mundial semelhante e variáveis (FAYER et al., 2007; DEL COCO et al., 2014; MA et al., 2015; ZHANG et al., 2018; FENG et al., 2019). Assim, observa-se que a frequência encontrada nesta pesquisa está de acordo com as relatadas por demais autores, reforçado pelos resultados de Li et al (2019), que relataram que os bovinos são considerados reservatórios comuns destes parasitos com uma prevalência mundial que varia de 2,2 a 37,6%. As maiores frequências de infecção por *Enterocytozoon* sp. em ovinos e caprinos 24 e 22%, respectivamente (Tabela 2), foram observadas nos ovinos criados sob sistema extensivo e nos caprinos criados sob sistema semi-intensivo, no entanto as frequências de *Enterocytozoon* sp. não foram determinantes para a infecção nem em relação ao sexo nem em relação a aptidão destes ruminantes. Apesar das altas frequências observadas em nossa pesquisa, há uma precariedade em informações e relatos de *E. bienersi* nestes animais. A frequência de 13% observada em suínos de nossa pesquisa é bem inferior a descrita por Fiuza et al (2015), que analisaram fezes de suínos com até um ano de idade mantidos em propriedades de subsistência no Estado do Rio de Janeiro e relataram um total de 59,3%, esta diferença pode ser explicada pelo sistema de criação que na nossa pesquisa era um sistema com mais cuidados com os dejetos dos animais em relação à pesquisa de Fiuza et al (2015) que utilizou animais criados em pocilgas rudimentares, ademais a idade dos suínos também pode ter sido um fator que propiciou a baixa prevalência, pois os suínos utilizados nesta pesquisa eram adultos, ao contrário com os utilizados por de Fiuza et al (2015). Demais resultados obtidos em países como Estados Unidos, República Tcheca, Alemanha, Japão, China e Tailândia, obtiveram frequências que variam de 14,8 a 94,0% (BUCKHOLT et al., 2002; SAK et al. 2008; REETZ et al., 2009; ABE; et al., 2010; ZOU et al., 2018; THATHAISONG et al., 2019). Segundo Medema (2001) a temperatura tem sido considerada um fator crucial para a sobrevivência de protozoários, principalmente para os microrganismos intestinais presentes em águas de rio, assim, a frequência de *Enterocytozoon* sp. observada pode estar relacionada ao clima desta região e a utilização de açudes como fonte de água para os animais desta propriedade.

*Entamoeba* spp. foi o gênero que manteve a maior frequência de infecção (54%), entre os animais, sendo detectada principalmente em bovinos e suínos, onde o nível de infecção foi significativamente maior em relação aos demais microrganismos pesquisados (Tabela 1). Estes resultados confirmam o que se observa na literatura científica e em demais estudos, como o realizado por El- Refaii (1993), com bovinos no Egito, onde foi observado uma frequência de

85% de infecção por *E. bovis*, sendo a frequência um pouco acima do que a encontrada em nosso trabalho. Vale ressaltar, que ruminantes como bovinos e ovinos são considerados hospedeiros comuns de espécies de *Entamoeba* spp. produtoras de cistos uninucleados (SKIRNISSON; HANSSON, 2006). Em ovinos e caprinos as frequências foram de 30% e 37% respectivamente (Tabelas 1) e estes apresentaram risco de infecção em relação ao sexo (Tabela 6). Estes dados refletem nas baixas frequências observadas por outros pesquisadores como Igbatigbi et al (2023), que observaram frequências reduzidas (12,6%) em caprinos aparentemente abatidos e demais animais de fazenda em Lokoja na Nigéria, local caracterizado pela superlotação de pessoas, má gestão e condições sanitárias precárias. Assim, neste estudo também foi possível observar a infecção por *Entamoeba* spp. em outros animais de convívio próximo, como os suínos, por exemplo. No entanto, vale ressaltar que os respectivos autores empregaram a técnica de flotação com NaCl seguida da observação microscópica, ou seja, técnicas distintas das utilizadas nesta pesquisa, que pode ter resultado tais diferenças nos resultados. Outra diferença discrepante também foi observada em um estudo de Ismail et al. (2010), realizado em áreas rurais da Coreia, com o intuito de avaliar a frequência da infecção parasitária em suínos e bovinos de corte, onde através da técnica de centrífugo-flutuação e esfregaço, foram detectadas frequências significativamente reduzidas em suínos (3,7%) e em bovinos (4,8%).

Em relação a contaminação da água de consumo, somente a água fornecida aos animais de duas propriedades, frequência de 13% (Tabela 3) foram detectados níveis de infecção, sendo uma delas, a mesma propriedade que testou frequência de 7% para *Enterocytozoon* sp. Em um trabalho realizado em quatro ribeirões no interior de Minas Gerais, por Silva (1968), utilizando técnica de sedimentação e microscopia direta observou que apenas um que servia de escoadouro de esgotos, testou positivo, o que possibilitou a presença destes protozoários na água destas propriedades. Neste mesmo trabalho, 27 cisternas poluídas, que apresentavam altos níveis de coliformes foram analisadas e apenas 10 apresentaram uma quantidade moderada destes patógenos, além disso, também foram analisados poços artesianos, tanques abertos e mananciais de abastecimento que não apresentaram nenhum isolados destes protozoários. Desse modo, os resultados de Silva (1968), utilizando técnicas mais simples, observou que a presença de protozoários entéricos foi relativamente menor nas cisternas e demais estruturas de abastecimento, quando comparado aos córregos e ribeirões que recebem material fecal, tal como observado em nossa pesquisa uma maior frequência de protozoários em água de consumo pelos animais, na maioria de açudes do qual as consumidas pelos residentes oriundas de poços e cisternas (Tabela 3). Ainda, segundo Neal (1953) esses fatos demonstram que este gênero

pode ocorrer em locais contaminados com esgotos que contenham uma grande quantidade de matéria orgânica em decomposição como acontece na maioria dos locais de consumo da água dos animais.

A infecção por *Giardia* spp. em bovinos foi de 35% (Tabela 1), sem significância quanto ao sexo (Tabela 7) e aptidão dos animais, se mantendo dentro das estimativas dos estudos direcionado por Trout et al (2004) que detectaram a presença de deste parasito em fezes de bezerros leiteiros, com uma frequência entre 20% a 81%. Assim, as frequências de *Giardia* spp. de nossos estudos na Microrregião de Muriaé com bovinos, foram bem mais elevadas quando comparadas as frequências observadas em um estudo realizado por Guimarães et al (2001), em uma pequena cidade de Minas Gerais, onde através da técnica de centrífugo-flutuação, seguida da observação ao microscópio óptico, foi observado uma frequência de apenas 9% em bezerros, frequência consideravelmente reduzida, que pode manter relações com o tipo de técnica empregada. Já em suínos, foi observada uma frequência de 14% (Tabela 1), semelhante a uma metanálise recente, onde agrupados *G. duodenalis* demonstraram uma positividade molecular que varia entre 5,6% a 14,3% em 12 países diferentes (ASGHARI et al., 2023) e, superior a um estudo realizado por Uysal et al (2009), onde foi relatada uma frequência de 3,7 % em suínos mantidos sob diferentes explorações na Turquia. Segundo Asghari et al (2023) este gênero é comumente detectado em diferentes nações e pode ser a responsável pela manutenção da infecção por este gênero em diferentes animais de produção, visto que, esta também é comumente relacionada a pequenos ruminantes. Nossos resultados para este protozoário verificou maior frequência para caprinos e ovinos com 76% e 57%, respectivamente, frequências superiores em relação aos observados para bovinos e suínos (Tabela 1) e demais trabalhos realizados como o de Calegar et al. (2023), que realizaram um estudo na região Nordeste onde foi detectada uma positividade de 21,2%, em suínos, frequência superior em relação a encontrada nesta pesquisa, enquanto em caprinos e ovinos, as frequências observadas foram relativamente inferiores com apenas 15,4% e 20%, respectivamente. Radavelli et al (2014) também observaram frequência bem reduzida em relação ao nosso trabalho, com uma frequência de 22,6% de infecção por *Giardia* spp. em caprinos em Santa Catarina, assim, tal frequência consideravelmente reduzida, pode manter relação a não utilização da técnica de biologia molecular, como da presente pesquisa. Frequências observadas em pequenos ruminantes na Índia foram bem superiores as observadas na China, no entanto, bem inferiores aos de nossa pesquisa, segundo Utaaker et al (2017), as cidades e aldeias periurbanas do norte da Índia, apresentaram frequência de 33,8%, enquanto nas províncias chinesas de Yunnan e Sichuan, foi observada frequência bem inferior em caprinos, 4,2% e

14,9%, respectivamente, sendo grande parte destes caracterizados pela estirpe E (XIE et al., 2018, ZHONG et al., 2018). Em Shaanxi e Henan, apenas 7,1% e 12,7 % das amostras fecais obtidas de cabras testaram positivas e, apesar da predominância da cepa E, demais genótipos também foram detectados incluindo as estirpes A e B, que devido seu potencial zoonótico (YIN et al., 2018), relevam a importância deste parasita na saúde única da região de nossa pesquisa. Em relação a água utilizada para consumo, este protozoário foi o único que demonstrou positividade naquelas consumidas pelos residentes, porém, testou negativa para água fornecida aos animais. Esse fato pode ser explicado por diferentes estudos como de Ramirez et al (2004) e Xiao et al (2004), que demonstram que o potencial zoonótico desse protozoário ainda não está totalmente elucidado, pois, na realidade, ainda pairam dúvidas sobre a fonte e reservatórios animais de *Giardia* spp. pela dificuldade de distinção de organismos espécie-específicos. A maioria dos animais que apresentaram altas taxas de contaminação por este parasito (caprinos e ovinos) recebem água proveniente de instalações com tratamentos adequados. Ademais muitas das fontes também são de água corrente ou de água do subterrâneo, que segundo Hancock et al (1997), passam pelo processo de infiltração pelas camadas do solo e, por esse motivo, apresentam menos densidade de cistos e esporos em relação aos mananciais superficiais. Assim, das propriedades que possuem águas superficiais (açudes), a maioria, não apresentaram casos de infecção por *Giardia* spp. em seus animais enquanto outras apresentaram casos isolados insignificantes. Em relação a contaminação da água dos residentes, estas podem ter sido contaminadas por dejetos de animais que pastejam próximos as fontes de abastecimento, o que foi observado em algumas propriedades, ou até mesmo através das fezes dos próprios moradores.

*Blastocystis* sp. foi um gênero encontrado em todos os animais com frequência média de 27% variando de 15 % em ovino à 37 % em bovinos (Tabela 1). Tan (2004), observou frequências em alguns animais de produção, como bovinos e suínos que variaram de 70% à 95% e de 95% à 100%, respectivamente, resultados bem mais elevados que de nossa pesquisa onde foram observadas 37% e 24% de frequência para bovinos e suínos, respectivamente, mas que são justificáveis pela Rr e OR. Em nossa pesquisa observou-se que caprinos criados em sistema semi-intensivo e suínos no sistema extensivo correm mais riscos de infecção (Tabela 20), enquanto o sistema semi-intensivo funciona como um fator de proteção para os suínos  $P=0,0001$ . Ao contrário de um estudo realizado por Moura et al (2018) no Triângulo Mineiro, onde as frequências de *Blastocystis* sp. detectadas em suínos (72,2%) e ovinos (33,3%) caracterizam maior probabilidade de infecção em suínos criados de modo semi-intensivo e em ovinos criados extensivamente. Embora não se tenha observados fatores de risco em bovinos

em nossa pesquisa a frequência de infecção relatada por Moura et al (2018), em bovinos (21,4%) foi inferior à nossa pesquisa (37%) (Tabela 1), demonstrando a importância deste protozoário na bovinocultura da Messorregião da Mata Mineira, onde a bovinocultura é a atividade pecuária mais desenvolvida. Em demais literaturas como de Abe et al (2002), também foram detectadas frequências mais altas em suínos (95%) e em bovinos (71%), em relação a presente pesquisa, reforçando que estes animais agem como potenciais reservatórios (PARKAR et al., 2007). Vale ressaltar que ovinos e caprinos também tiveram frequência significativas 15 e 31%, respectivamente (Tabela 1), incluindo estes animais como reservatórios e mantenedores da infecção em áreas rurais e importantes como potenciais veiculadores desta protozooses e na saúde única dos municípios da região estudada. Além disso, há uma escassez de dados que refutem do percentual deste parasito em águas fornecidas aos animais de produção e residentes. Em um estudo realizado por Flores-Carrero et al (2011) sobre a investigação de *Blastocystis* sp. em águas de tanque, cisterna e torneiras utilizadas para o consumo humano em uma escola da zona rural na Venezuela, também não foi possível o diagnóstico destes protozoários em nenhuma das fontes estudadas. Segundo os autores a carga parasitária foi insuficiente para detecção por microscopia direta de amostras de 1000 mL concentradas por centrifugo sedimentação com e sem coloração com lugol, além de microscopia do sedimento após cultivo em meio próprio, corrobora com os nossos resultados utilizando filtração de 10 litros de água e técnica mais sensível como a PCR demonstrando que independente da técnica utilizada é provável que a carga parasitária das amostras sejam baixa ou que outros fatores estejam influenciando na viabilidade destes protozoários nos locais de coleta. No entanto, Suresh e Smith (2005), observaram cistos viáveis de *Blastocystis* sp. em diferentes fontes hídricas de esgoto da Escócia e Malásia, sendo 38% de positividade em estações de tratamento, 50% em fontes influentes e 28% em efluentes, sendo este último local aquele que forneceu melhores evidências em relação ao potencial de transmissão por meio da água. Zaman e Khan (1994), também realizaram estudos com águas de esgoto do Paquistão, também foram observados cistos destes protozoários, o que indica que muitos métodos utilizados nas estações de tratamento não eliminam os cistos por completo. Assim, todos esses estudos evidenciam que mesmo com falta de cistos viáveis nas fontes de água analisadas, os animais infectados podem também ter adquirido esse protozoário, que no caso dos bovinos podem ser provenientes de águas superficiais (açudes), uma vez que a maioria dos infectados são provenientes das propriedades que têm esta fonte e os demais podem ter sido oriundos de água encanada ou de fontes naturais como a gruta isentos de tratamento ou que não receberam tratamentos suficientes.



*Balantioides* spp. demonstrou uma frequência de 16%, todavia não houve infecção por parte dos caprinos e ovinos, em bovinos apenas uma frequência de 3% e não foram observadas diferenças significativas quanto ao sexo e aptidão para pequenos e grandes ruminantes (Tabela 9). Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Choubisa e Jaroli (2013), com ruminantes domesticados na Índia, Sul do Rajastão, local onde há predominância de água perene, onde foi observado uma baixa frequência (3,37%) em bovinos, enquanto nos pequenos ruminantes não foram observadas infecções por este parasito, bem como nesta pesquisa, no entanto, vale ressaltar que os mesmos autores não utilizaram a técnica de biologia molecular. No entanto, em um estudo realizado com bovinos no Paquistão por Bilal et al (2009), com a utilização da técnica de sedimentação, foram observadas frequências em bovinos (25%) superiores em comparação a esta pesquisa, porém sem diferenças significativas quanto ao sexo e aptidão destes animais. Já a frequência observada em nossa pesquisa em suínos foi alta 67% (Tabela 1), não havendo diferenças significativas quanto ao sexo destes animais (Tabela 9). Tais resultados já eram esperados, visto que, estes animais são considerados potenciais reservatórios deste patógeno. No Brasil, Permin et al (2018), em seu trabalho obteve uma média de 99,9% e supões que esta alta frequência também está relacionada ao hábito dos suínos de fuçar no solo, também favorece a aquisição de cistos dispersos no ambiente. Outro estudo que manteve um resultado semelhante no Brasil e altamente significativo foi de Carregaro (2002), que relatou uma frequência de 90,49% de suínos infectados. Nishi et al (2000) também realizaram uma pesquisa com suínos criados sob sistema intensivo observando em Minas Gerais (8,8%) e São Paulo (18,7%) frequências bem reduzidas em relação aos demais autores e a presente pesquisa.

Outros fatores que contribuem para alta taxa de infecção nos suínos, está relacionado ao fato de que o trigo fornecido para os animais, principalmente durante a fase de engorda, é um alimento rico em carboidrato sendo considerado a principal fonte energética para *Balantioides* sp. e favorecem a formação de um ambiente intestinal propício para manutenção destes protozoários (SCHUSTER; ÁVILA, 2008; BARBOSA et al., 2015b). Ademais, durante a coleta também foi observado que a grande maioria dos produtores e tratadores, comumente jogavam água sobre o corpo dos suínos, durante o dia, deixando o recinto dos animais extremamente úmido, cooperando com a manutenção dos cistos nas pocilgas. Em relação a água fornecida tanto para animais quanto residentes, a maioria dos estudos são direcionados a residentes urbanos, além de redes escolares e hospitalares. Vale ressaltar que em nossa pesquisa não foi possível detectar *Balantioides* spp. na água fornecida aos residentes, no entanto, foi observado que sete propriedades forneciam água contaminada por *Balantioides* spp. aos

animais (Tabela 3). Desse total, duas não possuíam animais infectados e duas destas fontes pertenciam a mesma propriedade, onde situava os dois bovinos infectados, sendo uma amostra proveniente de um açude e a outra de uma caixa d'água que é utilizada como bebedouro tanto pelos bovinos quanto suínos, as demais propriedades que apresentaram contaminação da água, as amostras coletadas também foram provenientes de um açude, onde havia um bovino infectado. As demais estão voltadas a criação de ovinos, que não demonstraram infecção por este parasito, segundo o proprietário foi administrado medicamentos para combate de verminoses, o que pode ter contribuído com a negatividade dos casos, sendo a fonte utilizada oriunda de um córrego. Ferreira *et al.*, (2008) realizaram um estudo na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, onde foram coletadas amostras de águas superficiais de um córrego em uma área que sofre grandes influências do aterro sanitário, com o intuito de verificar a presença de *Balantioides* spp. e demais microrganismos, no entanto, as frequências de infecção testaram negativas.

Em relação a propriedade, aquela que obteve maior número de animais infectados pertence a Eugenópolis, local onde também foi encontrado todos os protozoários analisados nesta pesquisa, sendo a responsável pela maioria dos casos de infecção mista (Tabela 2). Propriedade do tipo familiar que abastece o mercado local e adota o sistema semi-intensivo para a criação de bovinos e sistema intensivo de Suínos Criados ao Ar Livre (SISCAL) para suínos. No entanto, a mesma, também alberga outros animais de produção como aves domésticas (galinhas comuns, galinha d'Angola e gansos) que de acordo com Santín (2006), são animais que também podem apresentar altas taxas de diferentes espécies de protozoários e agir como potenciais reservatórios, contribuindo com a manutenção das parasitoses no rebanho em conjunto com bovinos e suínos. Vale ressaltar que nesta propriedade, a água fornecida aos animais é proveniente de diferentes fontes com sistema de encanação, poços artesianos e açudes. Desse modo, segundo Berrilli *et al* (2012), a presença destes variados ambientes aquáticos propicia a manutenção dos cistos, oocistos e esporos ativos por longos período.

O risco de infecção em relação ao sexo, foi determinante para quase todos os animais infectados por *Entamoeba* spp., como as fêmeas de bovinos e caprinos e os ovinos machos, com exceção dos suínos machos que foram os únicos animais que demonstraram uma maior disposição a infecção por *Blastocystis* sp. (Tabela 6). Assim em relação aos bovinos e caprinos, o maior risco de infecção pelas fêmeas incluindo as destinadas a produção leiteira, pôde ser observado através dos estudos de Wilhelm *et al* (2017) onde sugerem que durante a fase de transição, de procriação ou lactação, estas podem vir a sofrer deficiência nutricionais e minerais indispensáveis a manutenção do metabolismo, que inclusive é considerado um desafio tanto

para fêmeas primíparas, quanto para multíparas (GONÇALVES et al., 2002). Sabe-se que estes protozoários se adaptaram ao trato gastrointestinal destes animais, sem gerar danos aparentes, no entanto, certas alterações metabólicas dos hospedeiros podem desencadear uma infecção e gerar danos à saúde do animal (NASCIMENTO, 2010). Vale ressaltar que em alguns casos, caprinos fêmeas voltados a aptidão leiteira, foram menos infectadas, visto que, segundo Perdigão et al (2016) os produtores tendem a escolher raças melhoradas geneticamente para produção de leite que apresentam maior resistência a enfermidades.

Em relação aos ovinos machos, Rodrigues (2005) cita que os mais velhos geralmente são mais resistentes à patologia clínica, todavia, podem apresentar infecções esporádicas inaparentes e agir com fontes de transmissão, principalmente para os demais machos durante o período de isolamento das fêmeas, onde comumente são observados comportamento homossexual entre carneiros adultos e jovens, que também pode cooperar com a transmissão dos patógenos. Ademais tanto os machos dos ovinos quanto de suínos (BARBOSA et al., 2015b), durante a fase de engorda, recebem uma alimentação em à base de concentrados que propicia a manutenção de certos protozoários em regimes intensivos.

Em relação ao manejo, os caprinos e suínos foram os únicos que apresentaram maior fator de risco ao parasitismo (Tabela 20), no entanto, a presente pesquisa demonstrou que os suínos criados de modo semi-intensivo obtiveram um fator proteção, bem como os caprinos sob sistema extensivo. No entanto, vale ressaltar que ambos os animais oriundos destes sistemas eram criados em quantidades menores em relação ao sistema intensivo. Assim, esse resultado pode ser relacionado com o estudo de Thomsem (2001), no qual, sugeriram que quanto maior a densidades destes animais, maior o nível de cistos dispersos no ambiente, que se desenvolvem de modo independente, ao contrário dos sistemas intensivos, que segundo Antunes et al (2011) dificulta a persistência dos cistos no local devido as limpezas impostas. Porém muitos sistemas intensivos, principalmente dos suínos, são locais que por vezes potencializam a ação dos patógenos, devido ao número de animais confinados e o alto nível de umidade destes recintos (LAGANÁ et al., 1998).

## 8. CONCLUSÃO

As análises realizadas neste trabalho demonstraram que dentre os protozoários analisados, *Entamoeba* spp., mesmo que por vezes considerada não patogênica, foi identificada em níveis consideráveis em conjunto com *Balantioides* spp., no qual na população dos suínos torna-se preocupante, mediante seu caráter zoonótico juntamente com *Giardia* spp. que além de ter frequência considerável em todas as espécies foi o único protozoário presente em água de consumo dos residentes da zona rural o que torna estes parasitas importantes na contaminação ambiental e na saúde única da Mesorregião da Zona da Mata Mineira. *Enterocytozoon* sp. e *Blastocystis* sp. mesmo relatados em menores frequências, em relação aos demais, mostraram ser importantes na infecção, principalmente de caprinos e ovinos incluindo estes animais como enzoóticos no rebanho da região

A técnica molecular empregada foi de suma importância para identificação dos respectivos gêneros e útil para detecção da frequência dos protozoários nestas propriedades da Região da Zona da Mata Mineira e caracterizar a importância dos protozoários na pecuária e saúde única local. Apesar da baixa frequência de alguns protozoários como *Cryptosporidium* spp., e *Balantioides* spp. o diagnóstico destes protozoários e os demais parasitos desperta um alerta em algumas propriedades, principalmente aquelas que mantêm a criação de bovinos e suínos, os mais foram afetados pelas parasitoses. Assim, a frequência de endoprotzoários importantes em saúde única caracterizou quadros de poliparasitismo, o que corresponde a um sério problema de Saúde Única, local, o que pode estar implicando diretamente com a qualidade de vida dos animais, residentes e o ambiente das propriedades da Região da Zona da Mata Mineira, podendo estes resultados ser extrapolado para regiões fronteiristas e similares no Estado do Rio de Janeiro.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; KIMATA, L.; ISEKI, M. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in a Japanese porcine population. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 10 (4), p. 425-427, 2010.

ABE, N.; NAGOSHI, M.; TAKAMI, K.; SAWANO, Y.; YOSHIKAWA, H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology*. v.106, n.3, p.203-12, 2002.

ACKERS, J.P. The diagnostic implications of the separation of *E. histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of Biosciences**, 27(6): 573-578, 2002.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.447-75, 2001.

ADL, S.M.; BASS, D.; LANE, E.C.; LUKES, J.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, A. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes, **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, p. 4–119, 2019.

AHMED, A.; IJAZ, M.; AYYUB, R. M.; GHAFAR, A.; GHOURI, H. N.; AZIZ, M. U.; JAVED, M. U. *Balantidium coli*. in domestic animals: An emerging protozoan pathogen of zoonotic significance. **Acta tropica**, v. 203, p. 105298, 2020.

AHMED, A.; IJAZ, M.; AYYUB, R.M.; GHAFAR, A.; GHOURI, H.N.; AZIZ, M. U. *Balantidium coli* in domestic animals: An emerging protozoan pathogen of zoonotic significance. **Acta Tropica**, v.203, p. 1-44, 2019.

AHMED, S. A.; KARANIS, P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. **Parasitology Research**, v. 117, n.3, p, 629-653, 2018.

AHMED, S. A.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the perspective from the Gulf countries. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6824, 2020.

AJIBO, F. E.; NJOGA, E. O.; AZOR, N.; IDIKA, I. K.; NWANTA, J. A. Epidemiology of infections with zoonotic pig parasites in Enugu State, Nigeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. v.20:100397, 2020.

AKIYOSHI, E. E.; MORRISON, H. G.; LEI, S.; FENG, X.; ZHANG, Q.; CORRADI, N.; MAVANIA, H.; TUMWINE, J. K.; KEELING, P. J.; WEISS, L. M.; TZIPIRI, S. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. **PLoS Pathogens**, v. 5, 2009.

ALDEYARBI, H. M.; ABU EL-EZZ, N. M.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the African perspective. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.14, p.13811-13821, 2016.

ALFELLANI, M. A.; TANER-MULLA, D.; JACOB, A. S.; IMEED, C. A.; YOSHIKAWA, H.; STENSVOLD, C. R. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. **Protist**, v. 164, n.4, p.497–509, 2013.

ALOISIO, F.; FILIPPINI, G.; ANTENUCCI, P.; LEPRI, E.; PEZZOTTI, G.; CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. **Veterinary parasitology**, v. 142, n.1-2, p. 154-158, 2006.

ANARGYROU, K.; PETRIKKOS, G. L.; SULLER, M. T. E.; SKIADA, A.; SIAKANTARIS, M. P.; OSUNTOYINBO, R. T.; VAIPOULOS, G. Pulmonary *Balantidium coli* infection in a leukemic patient. **American Journal of hematology**, v. 73, n. 3, p.180-183, 2003.

ANDRADE, B. L. A. D.; ROCHA, D. G. Doenças negligenciadas e bioética: diálogo de um velho problema com uma nova área do conhecimento. **Revista Bioética**, v.23, p.105-113, 2015.

ANTUNES, R. C., CARRAZZA, L. G., SANT'ANA, D. S., DE OLIVEIRA, M. T., & CARRAZZA, T. G. Prevalência de parasitos gastrintestinais em leitões de terminação relacionada com densidade de alojamento e sexo. **Pubvet**, v.5, Art-1019, 2011.

AREÁN, V. M.; KOPPISCH, E. Balantidiasis. A review and report of cases. **The American**

**Journal Pathology**, v. 22, n. 6, p.1089 – 1115, 1956.

ASGHARI A.; EBRAHIMI, M.; SHAMSI L.; SADREBAZZAZ, A.; SHAMS, M. Global molecular prevalence of *Giardia duodenalis* in pigs (*Sus domesticus*): A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, v.9, p.2, 2023.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L. OLSON, M.E.; Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n.4, p. 289-294, 2003.

BALDAUF, S.L. Epidemiologia molecular, evolução e filogenia de *Entamoeba spp.* An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes, **Journal of Systematics and Evolutution**, 2008.

BARBOSA, A. S.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A.; DIB, L. V.; AMENDOEIRA, M. R. R. Avaliação da frequência de *Balantidium coli* em suínos, tratadores de suínos e primatas não humanos no estado do Rio de Janeiro. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 43, n.3, p. 285-293, 2016.

BARBOSA, A.; BASTOS, O.M.P.; DIB, L.V.; SIQUEIRA, M.P.; CARDOZO, M.L.; FERREIRA, L.C. Gastrointestinal parasites of swine raised in different management systems in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p. 12, 2015a.

BARBOSA, A. S.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A.; PISSINATTI A FILHO, P. R. F.; DIB, L. V. Isolation and maintenance of *Balantidium coli* (Malmsteim, 1857) cultured from fecal samples of pigs and non-human primates. **Veterinary Parasitology**. v. 210(3-4), p.240-5, 2015b.

BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; HELLER, R.L. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.988-990, 1994.

BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C. **What is *Cryptosporidium*?** Reappraising its biology and phylogenetic affinities., *Trends Parasitology*, v. 10, ed. 22, p. 463-8, 2006.

BERKMAN, D.S.; LESCANO, A.G.; GILMAN, R.H.; LOPEZ, S.L.; BLACK, M.M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **The Lancet**, v.359, p.564-571, 2002.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; Di CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.191-195, 2012.

BIANCHI, M.V.; MELLO, L.S.; WENTZ, M.F.; PANZIERA, W.; SOARES, J.F.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D.; PAVARINI, S.P. Enterite e tiflocolite induzidas por parasitas fatais em equinos no Sul do Brasil. **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 443–450, 2019.

BILAL, C.Q.; KHAN, M.S.; AVAIS, M.; IJAZ, M.; KHAN, J.A. Prevalence and chemotherapy of *Balantidium coli* in cattle in the River Ravi region, Lahore (Pakistan). **Veterinary Parasitology**, v.163, p.1-2, 2009.

BÖHM-GLONING, B.; KNOBLOCH, J.; WALDERICH, B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. **Tropical Medicine International Health**. v.2, n. 53, p. 771–8, 1997.

BOROWSKI, H.; CLODE, P.L.; THOMPSON, R.C. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 11, p. 509-16, 2008.

BOROWSKI, H.; THOMPSON, R.; ARMSTRONG, T.; CLODE, P. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 13-26, 2010.



BOTTEREL, F.; MINOZZI, C.; VITTECOQ, D.; BOUREE, P. Pulmonary localization of *Enterocytozoon bieneusi* in an AIDS patient: Case report and review. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4800-4801, 2002.

BOUWKNEGT, M.; DEVLEESSCHAUWER, B.; GRAHAM, H.; ROBERTSON, L. J.; VAN DER GIESSEN, J. W. Prioritisation of food-borne parasites in Europe. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 9, p. 17-00161, 2018.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Agricultura familiar no Brasil e o censo agropecuário, Brasília, p.9, 2009.

BROOK, E.; HART C.A.; FRENCH N.; CHRISTLEY R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium spp.* infection in young calves. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 46-52, 2008.

BUCKHOLT, M.A.; LEE, J.H.; TZIPORI, S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine an 18- month survery at a slaughterhouse in Massachusetts. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 68, p. 2595-2599, 2002.

BYUN, J. W.; PARK, J.H.; MOON, B.Y.; LEE, K.; KWAK, D.; LEE, S.H. Identification of Zoonotic *Balantioides coli* in Pigs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and Its Distribution in Korea., **Animals**, v. 11, 2021.

CACCIÒ, S.M.; GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M. *Giardia*. Biology of Foodborne Parasites. **Boca Raton (FL): CRC Press**, p.149–174, 2015.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, p. 75-80, 2008.

CAEIRO, A.; GARROTE, A. R.; BETKOVA, S.; CARDOSO, O.; MANATA, M. J.; MALTEZ, F. Amebíase invasiva extraintestinal: experiência de quatro anos num serviço de doenças infecciosas. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**, v.15, n.3, 2019.

CALEGAR, D. A.; CORONATO-NUNES, B.; BACELAR, P. A.; MONTEIRO, K. J.; SANTOS, J. P.; EVANGELISTA, B. B.; CARVALHO-COSTA, F. A. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* infecting pigs and small ruminants in the state of Piauí, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. e07330, 2023.

CAPO, E.; SPONG, G.; NORMAN, S.; KONIGSSON, H.; BARTELS, P.; BYSTROM, P. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12; p. 1-19, 2019.

CARLI G. A. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. **São Paulo: Editora Atheneu**, 2001.

CARMENA, D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 20, p. 3-4, 2010.

CARREGARO, F.B.; Parasitos gastrointestinais em suínos raças/ tipos naturalizados do Distrito Federal, Brasília. **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade Brasília**, p. 31, 2002.

CARREIRO, C.; COELHO, C.D.; JORGE, J.L.B.P.; COSTA, N.O.G.; PAIVA, R.V; FILHO, W.L.T. Parasitos intestinais em suínos confinados em uma criação no município de Pinheiral, RJ, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38, n. 2, p. 117-22, 2016.

CAVALIER-SMITH T. “A revised six-kingdom system of life”. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 73, n.3, p.203- 266, 1998.

CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa, **European Journal**

**Protistology**, v. 5, ed. 50, 2014.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S.M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, ed. 7, p. 561-576, 2017.

CHINCHILLA, M.; REYES, L.; GUERRERO, O. M.; FRAJAN, M.; MORALES, M. T. *Enterocytozoon bieneusi* in Costa Rica: report of the first human case in central america. **Parasitología al día**, v. 21, n.3-4, p. 119-122, 1997.

CHOUBISA, S.L., JAROLI, V.J. Gastrointestinal parasitic infection in diverse species of domestic ruminants inhabiting tribal rural areas of southern Rajasthan, India. **Journal of Parasitic Diseases**, v.37, p. 271–275, 2013.

CIAN, A.; E. L.; SAFADI, D. OSMAN, M.; MORINIERE, R.; GANTOIS, N.; BENAMROUZ-VANNESTE S. Molecular Epidemiology of *Blastocystis sp.* in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. **PLoS One**. v. 12 n.1 e0169659, 2017.

CLARK, C. G. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. **Molecular Biochemistry Parasitology** v. 87 n. 1, p. 79–83, 1997.

CLARK, C. G.; *Entamoeba dispar*: an organism reborn. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n.4, p. 361-364, 1998.

CLARK, C. G.; KAFFASHIAN, F.; TAWARI, B.; WINDSOR, J. J.; TWIGG-FLESNER, A.; DAVIES-MOREL, M. C.; TANNICH, E. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2235-2239, 2006.

CLARK, C. G.; VAN DER-GIEZEN, M.; ALFELLANI, M. A.; STENSVOLD, C. R. Recent developments in *Blastocystis* research. **Advances in parasitology**, v. 82, p.1-32, 2013.

CLARK, C.G. Epidemiologia molecular, evolução e filogenia de *Entamoeba spp.* The

evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale, **Research Microbiology**, 2000.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; ANDREW THOMPSON, R.C. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, v.31, n.12, p.614 - 624, 2015.

COMPEAN, J. M. C.; BUSTOS-MARTÍNEZ, J. MARTINEZ, I. B.; DOSTA, M. C. M.; HAMDAN-PARIDA, A. Detection and typing of *Blastocystis sp.* in oysters (*Crassostrea virginica*) collected in Actopan River, Chachalacas, Veracruz. **International Journal Fisheries and Aquatic Studies**, v. 6, n. 2, p. 511-514, 2018.

CUI, Z.; LI, J.; CHEN, Y.; ZHANG, L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba spp.* **Infection, Genetics and Evolution**, v.75, p.104018, 2019.

CUNHA, F.S.; PERALTA, J.M.; PERALTA, R.H.S. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, p.1-12, 2019.

CUNHA, M.J.R. Diagnóstico e caracterização molecular de *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* e *Enterocytozoon bieneusi* em aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, Brasil., n. 97f, 2017.

CURRENT, W. L.; REESE, N. C.; ERNST, J. V.; BAILEY, W. S.; HEYMAN, M. B.; WEINSTEIN, W. M. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. **New England journal of medicine** v. 308, n. 21, p. 1252-7, 1983.

D'ANTÔNIO, R. G.; WINN, R. E.; TAYLOR, J. P.; GUSTAFSON, T. L.; CURRENT, W. L.; RHODES, M. M.; ZAJAC, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals Internal Medicine**, v. 103, n. 6, p. 886-8, Dec 1985.

DAS, K.; GANGULY, S. Genômica evolutiva e estrutura populacional de *Entamoeba histolytica*. **Computer, estrutura de Biotecnologia**, v. 12, p. 26-33, 2014.

DATTANI, S.; SPOONER, F.; RITCHIE, H.; ROSER, M. Diarrheal diseases. **Our World in Data**, 2023.

DEL COCO, V. F.; CÓRDOBA, M. A.; BILBAO, G.; de ALMEIDA CASTRO, P.; BASUALDO, J. A.; SANTÍN, M. First report of *Enterocytozoon bieneusi* from dairy cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.199, p.112-115, 2014.

DEL COCO, V.F.; CORDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. Cryptosporidiosis: na emerging zoonosis. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 41, ed. 3, p. 185-196, 2009.

DENG, L.; WOJCIECH, L.; GASCOIGNE, N. R.; PENG, G.; TAN, K. S. New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. **PLoS pathogens**, v.17, n.2 e1009253, 2021.

DENGIEL, B.; ZAHLER, M.; HERMANN, W.; HEINRITZI, K.; SPILLMANN, T.; THOMSCHKE, A.; LOSCHER, T.; GOTHE, R.; RINDER, H. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4495-4499, 2001.

DEPLAZES P., MATHIS A., MÜLLER C., WEBER R. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. **Journal Eukaryot Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 93, 1996.

DESPORTES, I. Y. A. F. B. A.; CHARPENTIER, Y. L.; GALIAN, A.; BERNARD, F.; COCHAND-PRIOU, B.; LAVERGNE, A.; MODIGLIANI, R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* ng, n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS 1. **The Journal of protozoology**, v.32, n.2, p.250-254, 1985.

DEVERA, R. Balantidiosis: algunas notas históricas y epidemiológicas en América Latina con especial referencia a Venezuela. **Saber**, v.30, p.5-13, 2018.

DIAMOND, L.S.; CLARK, C.G. A redescription of *E. histolytica* Schaudinn, 1903, separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.40,n.3, p. 340-344, 1993.

DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact, **Microbes Infection**, v. 4, ed. 10, 2002.

DORAN, J. W.; LINN, D. M. Bacteriological quality of run off water from pastereland. **Applied of Microbiology**, v.37, p.985-991, 1979.

DUNN, L. A.; BOREHAM, P.F.; STENZEL, D. J. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. **International Journal Parasitology**, v. 19, p. 43–56, 1989.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoanparasites: review of worldwide outbreaks-an update 2011–2016. **Water Research**, v.114, p. 14-22, 2017.

ELEGIO-GARCIA, L.; CORTES-CAMPOS, A.; CARDOSO-JIMENES, E.; Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. **Parasitology Research, Dusseldorf**, v.97, p.1-6, 2005.

EL-REFAILI, A. H. *Entamoeba bovis* Liebetanz 1905 recorded from large ruminants in Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 239-245, 1993.

ESTEBAN, J. G.; AGUIRRE, C.; ANGLES, R.; ASH LR, MAS-COMA S. Balantidiasis in Aymara children from northern Bolivian altiplano. **America Journal Tropical Medicine and Hygieni**, v. 59, p.922-927, 1998.

EYMAEL, D.; SCHUH, G. M.; TAVARES, R. G. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes tecnicas de coloração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 43, p. 309–12, 2010.

FARTHING, M. J. G. Giardiasis. *Parasitic Diseases of the liver and intestines*. **Gastroenterology Clinics of North America, Oxford**, v.25, n.3 p.493-515, 1996.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoan and helminths in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p.241-262, 1939.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. *Enterocytozoon bieneusi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. **Parasitology research**, v. 102, p.15-20, 2007.

FENG, Y.; GONG, X.; ZHU, K.; LI N.; YU, Z.; GUO, Y.; WENG, Y.; KVÁČ, M.; FENG, Y.; XIAO, L. Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China. **Parasitology Vectors.**, v. 12, p. 41. 2019.

FENG, Y.; RYAN, U.M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v.34, n. 11, p. 997-1011, 2018.

FERREIRA, M. D.; ABREU, K. A.; FERREIRA, P. C.; DA SILVA ALVES, R. I.; MUÑOZ, S. I. S. Parasitas e bactérias prevalentes no Córrego Monte Alegre localizado na área de influência do aterro sanitário de Ribeirão Preto. **O Mundo da Saúde**, v.32, n.3, p. 287-293, 2008.

FISCHER, W.M.; PALMER, J.D. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. **Molecular, Phylogenetics and Evolution**, v.36, p.602-622, 2005.

FIUZA, V. R. S.; LOPES, C. W. G., OLIVEIRA, F. C. R., FAYER, R.; SANTIN, M. New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 46-51, 2016.

FIUZA, V. R.; OLIVEIRA, F. C.; FAYER, R.; SANTIN, M. First report of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Brazil. **Parasitology Internacional**, v. 64, p. 18- 23, 2015.

FIUZA, V.R.S.; COSENDEY, R.I.J.; OLIVEIRA, F.C.R. Criptosporidiose suína associada aos Sistemas de produção no Estado do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de **Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 224-229, 2008.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n.3, p. 420-449, 2012.

FLORES-CARRERO, A. D.; PEÑA-CONTRERAS, Z.; DÁVILA-VERA, D.; COLMENARES-SULBARÁN, M.; MENDOZA-BRICEÑO, R. V. Investigación de *Blastocystis* sp. en agua de consumo humano en una población escolar de la zona rural del estado Mérida-Venezuela. **Kasmera**, v. 39, n. 2, p. 123-129, 2011.

FRICKER, C. R.; CRABB, J. H. Water-borne Cryptosporidiosis: Detection methods and treatment options. **Advances Parasitology**, 40: 241-278, 1998.

GARCIA, L. S. *Balantidium coli*. In: KHAN, NA. (Ed.). Emerging Protozoan Pathogens. **Taylor&Francis: New York**, p. 353-366, 2008.

GAYTHRI, T.; SURESH, K.; SUBHA, B.; KALYANI, R. Identification and characterisation of heat shock protein 70 in thermal stressed *Blastocystis* sp. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p.9, 2014.

GOLOMAZOU, E.; MAMEDOVA, S.; ESLAHI, A. V.; KARANIS, P. Cryptosporidium and agriculture: A review. **Science of The Total Environment**, 2024.

GONÇALVES, T. M.; OLIVEIRA, A.I.G.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, I.G. Curvas de Lactação em rebanhos da raça holandesa no estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.31, p. 1689-1694, 2002.

GUILLÉN, N. Patogenicidade e virulência de *Entamoeba histolytica*, o agente da amebíase. Virulence, **Departamento de Biologia Celular e Infecção, Institut Pasteur e Centre National de la Recherche Scientifique**, v. 14, ed. 1, 2022.

GUIMARÃES, A. M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R. A. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros no Brasil. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 53, p. 652-653, 2001.

HANDY, D.; EL- BADRY, A, A.; ABD, E.L.; WAHAB, W. Assessment of *Giardia* and



*Cryptosporidium* Assemblages/ Species and Their Viability in Potable Tap Water in Beni-Suef, Egypt Using Nested PCR/RFLP and Staining. **Iran Journal of Parasitology**, v. 14, n. 3, p.368-378, 2019.

HANCOCK, C. M.; ROSE, JOAN B.; CALLAHAN, MICHAEL. *Cryptosporidium* and *Giardia* in US groundwater. **Journal-American Water Works Association**, v. 90, n. 3, p. 58-61, 1997.

HAYES, EDWARD B.; MATTE, T. D.; O'BRIEN, T. R.; MCKINLEY, T. W.; LOGSDON, G. S.; ROSE, J. B.; JURANEK, D. D. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 21, p. 1372-1376, 1989.

HIJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.14, p.1719-1726, 2002.

HOLLNAS, C. E.; RODRIGUES, H. C.; OYADOMARI, V. M. A.; BOLSAN, A. C.; VENTURIN, B.; BONASSA, G.; KUNZ, A. The potential of animal manure management pathways toward a circular economy: A bibliometric analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, 29(49), 73599-73621, 2022.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, v.83, n.1, p.44-51, 1997.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da Técnica de Sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**.v.12, n.2. p.135-7, 2003.

HUSSAIN, R.; JAFERI, W.; ZUBERI, S.; BAQAI R, A. W.; AHMED, A.; ZAMAN, V. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 56, n. 5, p. 301, 1997.

HUSTON, C.D.; HAQUE, R.; PETRI, W. A. Molecular-based diagnosis of *E. histolytica*. ***Expert Reviews in Molecular Medicine***, 1(9):1-11, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária municipal: quantidade e valor dos produtos de origem animal, 2013.

IGBATIGBI, L. O.; OLOBANIYI, D. O.; ITODO, J. I.; ORICHA, M. I.; SHETTIMA, I. Gastro intestinal protozoa and helminths infestation in goats slaughtered within lokoja metropolis, kogi state. ***International Journal of Global Affairs, Research and Development***, v. 1, n. 2, p. 8-15, 2023.

INTERVET INTERNATIONAL, BV. *Cryptosporidium spp.* prevalence, relationship with the general inflammatory response, faecal microbiota and halofuginone lactate treatment in calves. ***European Medicines Agency***, 2022.

ISMAIL H.; JEON H.; Yu Y.; Do C.; Lee Y. Intestinal Parasite Infections in Pigs and Beef Cattle in Rural Areas of Chungcheongnam-do, Korea. ***Journal Parasitology***, v. 48, p.347-349, 2010.

JAMIL, M.; Ijaz, M. Prevalence, Hematology and Treatment of *Balantidium coli* among Small Ruminants in and Around Lahore, Pakistan, Kafkas Pakistan. ***Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, v. 21, n.1, p. 123–126, 2015.

JANARTHANAN, S.; KHOURY, N.; ANTAK, F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. ***Endoscopy***. v.43, n.6, p.185, 2011.

JESUS, L.P.; MÜLLER, G. Helminthos parasitos do estômago de suínos na região de pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 181-187, 2000.

JONES, R. Parasitas e doenças de ovelhas. **Veterinário de Parasitologia**, v.23, n.9, .145- 155, 2005.

KAUR, S.; GUPTA, A. Urinary balantidiasis: a rare incidental finding in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Cytology**. v. 33, n, 3, p. 169–171, 2016.

KEELING, P.J.; FAST, N.M. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.93-116, 2002.

KOH, W.; ANDREW THOMPSON, R.C.; CLODE, L.P. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 270, 2013.

KONDOVA, I.; MANSFIELD, K.; BUCKHOLT, M.A.; STEIN, B.; WIDMER, G.; CARVILLE, A.; LACKNER, A.; TZIPOR, S. Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5515–5519, 1998.

KRISHNAN, D.; GHOSH, S.K. Características morfológicas e de motilidade da forma monopodial estável de *Entamoeba* e sua importância no enquistamento. **Journal Infection Immunity**, v. 8, ed. 88, 2020.

KVÁC M.; KOUBA M.; VÝTOVEC J. Age related and housing dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137:202-209, 2006.

LAGANÁ, C.; NÄÄS, I.A.; TOLON, Y.B. Lámina de agua em corrales de gestación para suínos. **Agro-ciencia**, v.14, n.1, p.79-83, 1998.

LALLE, M. POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis*

and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **Internacional Journal of Parasitology**, v. 35, p. 207-213, 2005.

LENDNER, M.; DAUGSCHIES, A. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. **Parasitology**, v. 141, p. 1511–32, 2014.

LEVECKE, B.; DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; VISSER, L. G.; VAN ESBROECK, M.; VERCRUYSSSE, J.; VERWEIJ, J. J. Transmission of *Entamoeba nuttalli* and *Trichuris trichiura* from nonhuman primates to humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1871, 2015.

LEVINE, N. D. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. **Burgess Publishing Co**, Minneapolis, 1961.

LI, W.; FENG, Y.; SANTÍN, M. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health implications. **Trends of Parasitology**, v. 35, n. 6, p.436-451, 2019.

LI, X.; NGUYEN, T.; XIAO, C.; LEVY, A.; AKAGI, Y.; SILKIE, S.; ATWILL, E. R. Prevalence and Genotypes of *Cryptosporidium* in Wildlife Populations Co-Located in a Protected Watershed in the Pacific Northwest, 2013 to 2016. **Microorganisms**, v.8, n.6, p. 914, 2020.

LIMA, J. D. Coccidiose dos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v13, suplemento1, p.9-13, 2004.

LINTONG, P. M.; SAMBUAGA, M. K.; TAMBAJONG, E. H. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. **Asian Pacific Journal Tropical Diseases**, v.2, n.8, p. 965, 2012.

LOBO, M.L.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-years study on HIV-positive and negative patients. **International Journal for Parasitology**, v.41, p. 197-205, 2012.

LODI, P. J. E., CHITOLINA, M., CHIOSSI, E., GRISS, L., MAESTRI, R., ZANELLA, L., CAMILLO, G., PRESTES, A.; SILVEIRA, S. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em granjas

unidades produtoras de leitões no oeste de Santa Catarina. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa E Extensão**, 2022.

LONG, H. Y.; HANDSCHACK, A., KÖNIG, W.; AMBROSCH, A. “*Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells”. **Parasitology Research**, v.87, n.12, p.1029-1030, 2001.

LYNN, D. H. Intramacronucleata: Litostomatea – Simple Ciliates but highly derived. **The Ciliated Protozoa**. Springer, New York, p. 187 – 208, 2010.

MA, J.; LI, P.; ZHAO, X.; XU, H.; WU, W.; WANG, Y.; GUO, Y.; WANG, L.; FENG, Y.; XIAO, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n.3-4, p. 220-7, 2015.

MAHMOUD, M. S.; SALEH, W. A. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. **Journal Egypt Society Parasitology**, v. 33, p.13–30, 2003.

MATHIS, A.; WEBER, R.; Deplazes, P. Zoonotic potential of the microsporidia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.423-425, 2005.

MATSUBAYASHI, M.; SUZUTA, F.; TERAYAMA, Y.; SHIMOJO, K.; YUI, T.; HARITANI, M.; SHIBAHARA, T. Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: implications for pathogenicity. **Parasitology Research**, v.113, p. 3023-3028, 2014.

MCALLISTER T.A.; OLSON M.E.; FLETCH A.; WETZSTEIN M.; ENTZ T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. **Can Veterinary Journal**, 46:47-55, 2005.

MC DONALD, J. D. On *Balantidium coli* and *B. suis* (sp. nov.). **University of California Publications in Zoology**, p, v.20,p.243–246, 1922.

MEDEMA, G. J. S. Modeling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. **Water Research**, v.35, p. 4307-4316, 2001.

MESSNER, M. J.; BERGER, P. *Cryptosporidium* infection risk: results of new dose-response modeling. **Risk Analysis**, v. 36, n. 10, p. 1969-1982, 2016.

MODOLO, J. R.; GONÇALVES, R. C.; KUCHEMUCK, M. R. G. Ocorrência de Crptosporidiose em bezerros na região de Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n.1, p. 9-10, 1988.

MOHAMED, A. M.; AHMED, M. A.; AHMED, S. A.; AL-SEMANY, S. A.; ALGHAMDI, S. S.; ZAGLOOL, D. A. Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. **Infectious Agents Cancer**, v.12, n.1, p.21, 2017.

MOLINA, J. M.; SARFATI, C.; BEAUVAIS, B.; LÉMANN, M.; LESOURD, A.; FERCHAL, F.; CASIN, I.; LAGRANGE, P.; MODIGLIANI, R.; DEROUIN, F. Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 217-221, 1993.

MONIS, P.T.; ANDREES, R.H.; MAYRRHOFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, n.1, p.29-38, 2003.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZALEZ, A.; GOMEZ, A.; GARCIA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMENEZ, C. *E. histolytica* and *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV+/AIDS patients in México City. **Experimental Parasitology**, v.110, p. 331-334, 2005.

MORGAN, U. M.; SARGENT, K. D.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer of the rDNA repeat unit among isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. **Parasitology** 118, 49-58, 1998.

MOURA, R. G. F.; OLIVEIRA-SILVA, M. B. D.; PEDROSA, A. L.; NASCENTES, G. A. N.; CABRINE-SANTOS, M. Occurrence of *Blastocystis sp.* in domestic animals in Triângulo Mineiro area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, p. 240-243, 2018.

MOUSA, E.A A.; SAKAGUCHI, M.; NAKAMURA, R. A dinâmica das mudanças ultraestruturais durante o encistamento de *Entamoeba invadens*. **Parasitologia**, v. 12, ed. 147, p. 1305 – 1312, 2020.

MUNGTHIN, M.; SUBRUNGRUANG, I.; NAAGLOR, T.; AIMPUN, P.; AREEKUL, W.; LEELAYOOVA, S. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.473-476, 2005.

NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.24, p.253-267, 2015.

NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.47-51, 2009.

NASCIMENTO, C.; NÉRI, H.; SILVA, L.; SILVA, R.; COELHO, C.; VASCONCELOS, N.; VALA, H. *Entamoeba coli* no homem e nos animais domésticos. **Parasitológica Portuguesa**, v. 17, p. 121, 2010.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (NIAID). **Emerging Infectious Diseases/ Pathogens**, 2018.

NEAL, R. A. Studies on the morphology and biology of *Entamoeba moshkovskii*, Tshalaia, 1941. **Parasitology**, v. 43, p. 243-268, 1953.

NETTO, M. M.; DINIZ, A. M. A. A formação geohistórica da Zona da Mata de Minas Gerais. **R. RA'E GA, Curitiba**, n. 12, p. 21, 34, 2006.

NEIVA, A.; MARQUES, CUNHA, A.; TRAVASSOS, L. Contribuições Parasitológicas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.6, p. 180–191, 1914.

NILLES-BIJE, M. L.; RIVERA, W. L. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. **Parasitology Research**, v. 106, p.387 -394, 2010.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v.70, p.4, 1976.

NISHI, A. M.; GENNARI, S. M.; LISBOA, M. N. T. S.; SILVESTRE, A. CAPRONI, J. R. L.; UMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biologia**, v. 67, p.199-203, 2000.

NÓBREGA, J. B. F.; BRITTO, S. G. Uma breve revisão sobre a infecção por *Balantidium Coli* em humanos e outros animais. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 2, p. 6034-6048, 2023.

NOURRISSON, C., SCANZI, J., PEREIRA, B., NKOUDMONGO, C., WAWRZYNIAK, I., CIAN, A.; POIRIER, P. “*Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel Syndrome and control subjects”. **Public Library of Science One**, v. 9, n.11, p. e111868, 2016.

O’HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada, 193- 200, v. 90, n. 3, ed. 4, p. 233-244, 2000.

O’HANDLEY, R.M. *Giardia* in farm animals. p. 97–105. **Wallingford, CAB International**. 2002.

O’DONOGHUE, J.P. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals, **International Journal for Parasitology**, v. 25, ed. 2, p. 139- 195, 1995.



OLIVEIRA, A. S.; HERNÁNDEZ, C. G.; OLIVEIRA, K. R. *Balantidium coli* infection, immune status and comorbidities: literature review. **Journal of Tropical Pathology**, v. 50, n. 4, p. 265-284, 2021.

OLIVEIRA, H. G.; ANTONELLO, R.; FIDÉLIS, A. J.; RINALDI, B. J. Energia, Sociedade e Meio Ambiente no Desenvolvimento de Um Biodigestor: a Interdisciplinaridade e a Tecnologia Arduino para Atividades Investigativas. **Química e Sociedade**, p. 144-152, 2018.

OLIVEIRA, J. S. D.; MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; CORTELA, I. D. B.; VALADARES, M. F.; MATOS, A. M. R. N. D.; FREIRE, R. L. Identification, molecular characterization and factors associated with occurrences of *Cryptosporidium spp.* in calves on dairy farms in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.30, 2021.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, p.185-191, 2004.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial Infection in a Calf. **Veterinary Pathology Online**, v. 8, n. 5-6, p. 479-484, 1971.

PARIJA, S. C.; JEREMIAH, S. S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. **Tropical Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 7-25, 2013.

PARKAR. U.; TRAUB, R. J.; KUMAR, S.; MUNGTHIN, M.; VITALI, S.; LEELAYOOVA, S. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. **Parasitology**. v. 134, p. 359-67, 2007.

PAUL, S.; SHARMA, D.K.; BORAL, R.; MISHRA, A.K.; NAYAKWADI, S.; BANERJEE, P.S.; PAWAIYA, R.S. Cryptosporidiosis in goats: a review. **Journal Advanced Veterinary Animal Science**, v.2, p.35,p. 49-54, 2014.

PERDIGÃO, N. D. F. O.; OLIVEIRA, L.; CORDEIRO, A. Sistemas de produção de caprinos leiteiros. In: Workshop sobre produção de caprinos na região da Mata Atlântica. **Anais Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos**. p. 11-35, 2016.

PERDOMO, D.; AÏT-AMMAR, N.; SYAN, S.; SACHSE, M.; JHINGAN, G. D.; GUILLÉN, N. Cellular and proteomics analysis of the endomembrane system from the unicelular *E. histolytica*. **Journal of Proteomics**, v.112, p. 125-140, 2015.

PEREIRA, M. N. Bovinocultura de leite em Minas Gerais. **In: Semana de zootecnia Diamantina. Anais, Viçosa, MG: UFV, p. 119- 124, 2003.**

PERMIN, A.; YELIFARI, L.; BLOCH, P. Parasites in cross bred pigs in the Upper East region of Ghana. **The Royal Veterinary and Agriculture Univesity**, v.87, p.63-71.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, v.213, p.321-333, 2010.

POMAJBIKOVÁ, K.; OBOROMIK, M.; HORÁK, A.; PETRZELKOVA, K.J.; GRIM, J.N. Novel Insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst – forming ciliates, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.3, p. 1-10, 2013.

POMAJBÍKOVÁ, K.; PETRŽELKOVÁ, K.J.; PROFOUSOVÁ, I.; MODRÝ, D. Discrepancies in the occurrence of *Balantidium coli* between wild and captive African great apes. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 1139-1144, 2010.

PONCE GORDO, F.; SALAMACA, F. F.; MARTÍNEZ, D. R. Genetic heterogeneity in Internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). **Protist**, v. 162, p.774-794, 2011.

PONCE-GORDO, F.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. Tentative identification of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. **Veterinary Parasitology**. v. 157, p.41–49, 2008.

PONCE-GORDO, F.; RODRÍGUEZ, G.J.J. *Balantioides coli*. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 424-431, 2021.

PUMIPUNTU, N.; PIRATAE, S. Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. **Veterinary World**, v. 11, p. 681, 2018.

RADAVELLI, W. M.; PAZINATO, R.; KLAUCK, V.; VOLPATO, A.; BALZAN, A.; ROSSETT, J.; SILVA, A. S. D. Occurrence of gastrointestinal parasites in goats from the Western Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p.101-104.

RAJAMANIKAM, A.; GOVIND, S. K. Amoebic forms of *Blastocystis* sp. - evidence for a pathogenic role. **Parasitology Vectors**, v. 6, n. 1, p. 295, 2013.

RAMÍREZ, A. D.; RAMÍREZ-IGLESIAS, L. N.; PLAZA, R. M. G.; ROMÁN, R. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. el pós-parto, em vacas mestizas de doble propósito. **Revista Científica**, v. 2, n.2, p. 614-616, 2002.

RAMIREZ, J. D.; SANCHEZ, A.; HERNANDEZ, C.; FLOREZ, C.; BERNAL, M. C.; GIRALDO, J. C.; REYES, P.; LOPEZ, M. C.; GARCIA, L.; COOPER, P. J.; VICUNA, Y.; MONGI, F.; CASERO, R. D. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. **Infections Genetic and Evolution**, v.41, p.32–35, 2016.

RAMÍREZ, L. C. G.; VALVERDE, J. M. P.; DURÁN, N. E. S.; PILCO, J. A. O. Enteroparasitosis: un problema sanitario en residentes de la zona montañosa de Ecuador. **Anatomía Digital**, v.6, n.4.3,p. 143-160, 2023.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and infection**, v. 6, n. 8, p. 773-785, 2004.

REETZ, J.; NOCKLER, K.; RECKINGER, S.; VARGAS, M. M.; WEISKE, W.; BROGLIA, A. Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. **Paratology International**, v. 58, p. 285-292, 2009.

REY, L. Ancestralidade genômica como fator predisponente para amebíase invasiva. **Bases da Parasitologia Médica, Guanabara Koogan**, ed. 3, p. 379, 2010.

REY, L. Bases da Parasitologia médica. **Guanabara Koogan**, 5<sup>o</sup> ed. ,2010.

RINDER, H.; JANITSCHKE, K.; ASPOCK, H.; SILVA, A.J.; DEPLAZES, P.; FEDORKO, D.P.; FRANZEN, C.; FUTH, U.; LEHMACHER, A.; MEYER, C.G.; MOLINA, J.M.; SANDFORT, J.; WEBER, R.; LOSCHER, T. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. **Journal of clinical microbiology**, v.36, p.1814- 1818, 1998.

ROBERTS, T.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. **European Journal Clinical Microbiology Infections Diseases**. v. 32, n.3, p. 335–43, 2013.

ROCHA, L.S. Parasitoses intestinais infantis e sua associação com estado anêmico, revisão sistemática de literatura. **Revista interdisciplinar de ciência médicas**, 2017.

RODRIGUES, P. R. C. Medicina de Ovinos e Caprinos, 2005.

RYAN, U.; HIJAWI, N.; XIAO, L. Foodborne cryptosporidiosis. **International journal for parasitology**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2018.

RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJAWI, N. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. **Water Research**, v.15, p.305-313, 2016.

RYAN, U.; ZAHEDI, A.; FENG, Y.; XIAO, L. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. **Animals**, v.11, n.11, p. 3307, 2021.

SAK, B.; KUCEROVÁ, Z.; KVAC, M.; KVETONOVÁ, D.; ROST, M. SECO, E.W. Soropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.335-337, 2010.

SAK, B.; KVAC, M. HANZLIKOVÁ, D.; CAMA, V. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 220-224,

2008.

SAMIE, A.; ELBAKRI, A.; ABUODEH, R. Amebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis. **Current Topics in Tropical Medicine**, 201-226, 2012.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n.1, p. 1-10, 2013.

SANTÍN, M. *Enterocytozoon bieneusi*. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FAYER, Y. (Eds.). Biology of Foodborne Parasites. **Boca Raton**, p.149–174, 2015.

SANTÍN, M.; FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 363-371, 2011.

SANTIN, M.; GOMEZ-MUNOZ, M. T.; SOLANO-AGUILAR, G.; FAYER R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis sp.* from humans and animals. **Parasitology Research**, v.109, n.1, p.205–12, 2011.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; VECINO, J. A.; DUBEY, P. J.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, p. 334-339, 2006.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.122, n.2, p.103-117, 2004.

SAYGILI, E. I.; AKCAY, T.; KONUKOGLU, D.; PAPILLA, C. Glutathione and glutathione-related enzymes in colorectal cancer patients. **Journal Toxicology Environmental Health A**, v. 66, n.5, p. 411-5, 2003.

SCHMIDTE, G.D.; ROBERTS, LSEJANOVY, J. Fundação de Parasitologia. **McGrawhill, Boston, Massachusetts**, 670, 2000.

SCHOENIAN, S. Diarrhea (scours) in small ruminants. **Comp External Journal. Maryland University**. 2007.

SCHUSTER, F. L.; ÁVILA, R. L. Current World Status of *Balantidium coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. 21, 626-638, 2008.

SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. In cat feces. **Journal of Parasitology**. v. 89, n. 2, p.423- 426, 2003.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. **Journal Computer Ther**, v.36, p.266-75, 1923.

SHIRLEY, D. A. T.; FARR, L.; WATANABE, K.; MOONAH, S. A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis; In Open forum infectious diseases. **Oxford University Press**, v. 5, n. 7, p.161, 2018.

SHIRLEY, D.A.; MOONAH, S. Fulminant Amebic Colitis after Corticosteroid Therapy: A Systematic Review, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, ed. 7, p. 1- 13, 2016.

SILVA, E. F. Isolamento em algumas áreas de Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.10, p. 383- 388, 1968.

SILVA JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H.; ROCHA, C. M.; GUIMARÃES, A. M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 690-696, 2011.

SILVA, E. F.; GOMES, M.A. Amebíase: *E. histolytica*/*E. dispar*. **Parasitologia Humana**, 12.ed., p. 127-138, 2011.

SINGH, N.; NAIYER, S.; BHATTACHARYA, S. Análise ultraestrutural e alterações morfológicas durante a diferenciação de trofozoíto a cisto em *Entamoeba invadens*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 242, n. 111363, 2021.

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. *Giardia*. Culture of *G. lamblia* in serum-free médium: Lipid metabolism in *Giardia*: TIP, **Jounal Parasitology**, v. 17, p. 316-319, 2001.

SKIRNISSON, K.; HANSSON, H. Causes of diarrhoea in lambs during autumn and early winter in an Icelandic flock of sheep. **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 19, p. 43-57, 2006.

SLAPETA, J. Criptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 13, ed. 12, p. 1-14, 2013.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v. 14, n. 1, p. 14-22, 1998.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends Parasitology**, v. 21, n.3, p. 133-42, 2005.

SODGI, M.; BRASILLE, P.; GONZALEZ-CANALJ, G.; CORNET, M.; PIKETTY, C.; WEISS, L. Unusual pulmonary *Enterocytozoon bienewsi* microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.36, p. 230-231, 2004.

SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. Parasitologia humana. **São Paulo, Atheu**, 10 ed., p. 107113, 2000.

STANLEY JÚNIOR, S.L. Amoebiasis. **The Lancet**, v.361, n.9362, p. 1025-1034, 2003.

STENSVOLD, C. R.; ARENDRUP, M. C.; JESPERGAARD, C.; MOLBAK, K.; NIELSEN, H. V. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. **Diagnostic Microbiology Infection Diseases**, v.59, n. 3, p.303, 2007.

STENSVOLD, C. R.; LEBBA, M.; CLARK, C. G. Caracterização genética de produtor de cisto uninucleado *Entamoeba* spp. de ruminantes. **Internacional Journal Parasitology**, v. 40, p. 775-778, 2010.

STENSVOLD, C. R.; LEBBAD, M.; CLARK, C. G. Characterisation of uninucleated cystproducing *Entamoeba* spp. from ruminants. **International Journal Parasitology**, 2010.

STENSVOLD, C. R.; LEWIS, H. C.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; NIELSEN, S. S.; OLSEN, K. E. E. T. A. L. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. **Epidemiology Infection**. v.137, p.1655–63, 2009.

STENZEL, D.; BOREHAM, P. *Blastocystis hominis* revisited. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 9, n.2, p.563–84, 1996.

SUKPRASERT, S.; RATTAPRASERT, P., HAMZAH, Z.; SHIPIN, O.V.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P. PCR detection of *Entamoeba* spp from surface and waste water samples using genus-specific primers. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 39, p. 6-9, 2008

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A. A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*, **Emerging Infection Diseases**, v. 9, ed. 11, p. 1444-1452, 2003.

SURESH, K.; SMITH, H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. **European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases**, v.23, p.509–511, 2005.

TAN, K. “*Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies”. **Veterinary Parasitology**, v. 126.1, n.2, p.121-144, 2004.

TAN, K. S. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* sp. **Clinical Microbiology**, v. 21, p. 639–65, 2008.



TAN, T. C.; KEVIN, S. W.; M, M.; YAP, E. H. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 7, p. 789-804, 2002.

TAN, T. C.; ONG, S. C.; SURESH, K. G. “Genetic variability of *Blastocystis sp* isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients”. **Parasitology Research**, v. 105.5, p. 1283-1286, 2009.

TAN, T. C.; SURESH, K. G. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. **Parasitology Research**, v. 99, p.737–742, 2006.

TANYUSKEL, M.; PETRI, W. A. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Microbiology**, v.16, n.4, p.713-729, 2003.

THATHAISONG, U.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; LEELAYOOVA, S.; MUNGTHIN, M. Prevalence and Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* among Pigs in Chonburi Province, Eastern Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019.

THERGARAJAN, G.; GOVIND, S. K.; BHASSU, S. In vitro and in vivo thermal stress induces proliferation of *Blastocystis*. **Parasitology Reserch**, v. 117, n.1, p.177-187, 2018.

THOMPSON, H. P.; DOOLEY, J. S. G.; KENNY, J.; MCCOY, M.; LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; XIAO, L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium spp.* in neonatal calves in northern Ireland. **Parasitology Research**. v.100, n.3, p. 619-624, 2007.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 210-213, 2000.

THOMSEM, L. E. The influence of stocking rate on transmission of helminth parasites in pigs on permanent pasture during two consecutive summers. **Veterinary Parasitology**, n. 99, p. 129-146, 2001.

THOMSON, S.; HAMILTON, C. A.; HOPE, J. C.; KATZER, F.; MABBOTT, N. A.; Morrison, L. et al. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. **Veterinary Research**. 48(1): 1-16, 2017.

TOMAZIC, M.L.; GARRO, C.; SCHNITTGER, L. *Cryptosporidium*: Parasitic Protozoa of farm animals and pets. **Springer International Publishing**, p. 11-54, 2018.

TROUT, James M. et al. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 179-186, 2004.

TULLY, T.N., SHANE S.M. Husbandry practices as related to infectious and parasitic diseases of farmed ruminants. *Revue Scientifique Technique*, v.15, p, 73-89, 1996.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n.10, p.1047-58, 2002.

UTAAKER, K. S., MYHR, N., BAJWA, R. S., JOSHI, H., KUMAR, A., & ROBERTSON, L. J. Goats in the city: prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in extensively reared goats in northern India. **Acta veterinaria scandinavica**, v.59, p.1-9, 2017.

UYVAL, H.K.; BORAL, O.; METINER, K.; ILGAZ, A. Investigation of intestinal parasites in pigs feces that are also human pathogens. *Turkey Parasitol.* v. 33, p.218-22, 2009.

VAN KEULEN, H.; MACECHKO, P.T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis, **Veterinary Parasitology**, v. 10, ed. 108-102, p. 97-107, 2002.

VANATHY, K.; PARIJA, S.C.; MANDAL, J.; HAMIDE, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cryptosporidiosis: A mini review. **Tropical Parasitology**, v. 7, n.2, p. 72 – 80, 2017.

VDOVENKO, A. A. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. **Parasitology Research**, v. 86, n.8, p.10, 2000.

VILLANUEVA-GARCIA, C.; GORDILLO-CHAVEZ, E. J.; LOPEZ-ESCAMILLA, E. RENDON-FRANCO, E.; IRAIS, MUÑOZ-GARCIA C. Clarifying the Cryptic Host Specificity of *Blastocystis sp.* isolates from *Alouatta palliata* and *A. pigra* Howler Monkeys. **Plos one**, v. 12, n.1, 2017.

VOLOTÃO, A.C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A.; PERALTA, J.M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using giardin gene: A phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v.102, p.10-19, 2007.

VOSSBRINCK, C. R.; MADDOX, J. V.; FRIEDMAN, S.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. **Nature**, v. 326, n. 6111, p. 411-414, 1987.

WANG, W.; OWEN, H.; TRAUB, R. J.; CUTTELL, L.; INPANKAEW, T.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p.264-269, 2014.

WAWRZYNIAK, I.; POIRIER, P.; VISCOGLIOSI, E.; DIONIGIA, M.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; ALAOU, H. E. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. **The Advanced Infection Diseases**, v.1, p.167- 178, 2012.

WEBER, R.; BRYAN, R. T.; SCHWARTZ, D. A.; OWEN, R. L. Human microsporidial infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, p. 426-461, 1994.

WEBER, R.; BRYAN, R.T.; BISHOP, H.S.; WAHLQUIST, S.P.; SULLIVAN, J.J.; JURANEK, D.D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p. 1323-7, 1991.

WEEDALL, G.D.; HALL, N. Genômica evolutiva de *Entamoeba spp.* **Research Microbiology**, v. 162, p. 637-645, 2011.

WEIKEL, C. S.; JOHNSTON, L. I.; DE SOUSA, M. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazil: Association with Sporadic Diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 5, p. 963–965, 1985.

WESTRAM, A. M.; BAUMGARTNER, C.; KELLER, I.; JOKELA, J. Are cryptic host species also cryptic to parasites? Host specificity and geographical distribution of acanthocephalan parasites infecting freshwater Gammarus. **Infection Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1083–1090, 2011.

WILHELM, A.L.; MAQUIVAR, M.G.; BAS, S.; BRICK, T.A.; WEISS, W.P.; BOTHE H.; VELEZ, J.S.; SCHUENEMANN, J. M. Effect of serum calcium status at calving on survival, health, and performance of postpartum Holstein cows and calves under certified organic management. **Journal of Dairy Science**, v.100, p. 3059-3067, 2017.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I., ESCALANTE, A.A., MONTALI, R.J., FAYER, R., LAL, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

XIE, S. C.; ZOU, Y.; CHEN, D.; JIANG, M. M.; YUAN, X. D.; LI, Z.; ZHU, X. Q. Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Yunnan Black Goats in China. **Biomed Research International**, 2018.

YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. C.; ZOC-CAL, R. Dinâmica da produção de leite no Brasil no período de 1990 a 2004. Qualidade e eficiência na produção de leite. 1. ed. Juiz de Fora - MG: Embrapa Gado de Leite, v. 1, p.219-230, 2006.

YBAÑEZ, R. H. D. Detecção de parasitas gastrointestinais em granjas comerciais de suínos em Cebu, Filipinas. **Revista de Gestão Agrícola e Tecnológica**, v. 20, n. 1, p. 27-37, 2017.

YITBAREK, M. B. Livestock and livestock product trends by 2050. **IJAR**, 4, 30, 2019.

YIN, Y. L.; ZHANG, H. J.; YUAN, Y. J.; TANG, H.; CHEN, D.; JING, S.; ZHAO, G. H. Prevalence and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* from goats in Shaanxi province, northwestern China. **Acta Tropica**, v.182, p. 202-206, 2018.

YOSHIKAWA, H.; TOKORO, M.; NAGAMOTO, T.; ARAYAMA, S.; ASIH, P. B.; ROZI IE. Molecular survey of *Blastocystis sp.* from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. **Parasitology International**. v. 65, n. 6 Pt B, p.780–4, 2016.

ZAMAN, V. *Balantidium coli*. Parasitic Protozoa. **Academic Press, New York**, p. 633-653; 1978.

ZAMAN, V.; KHAN, K. Z. A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.5, p.792-793, 1994.

ZHANG, Q.; CAI, J.; LI, P.; WANG, L.; GUO, Y.; LI, C.; LEI, M.; FENG, Y.; XIAO, L. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in Tibetan sheep and yaks. **Parasitology Research**, v. 117, p. 721-727, 2018.

ZHANG, X.; ZHANG, S.; QIAO, J. Y.; WU, X.; ZHAO, L.; LIU, Y.; FAN, X. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p.1165-72, 2012.

ZHAO, G. H.; Hu, X. F.; Liu, T. L.; Hu, R. S.; Yu, Z. Q.; Yang, W. B. Molecular characterization of *Blastocystis sp.* in captive wild animals in Qinling Mountains. **Parasitology Research**, v. 116, n. 8, p. 2327–2333, 2017.

ZHAO, W.; LI, M.; XIONG, F.; ZHANG, D.; WU, S.; ZOU, H. Identification of Intracellular Bacteria in the Ciliate *Balantidium ctenopharyngodoni* (Ciliophora, Litostomatea). **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 417-426, 2020.

ZHONG, Z., TU, R., OU, H., YAN, G., DAN, J., XIAO, Q., ... & PENG, G. Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from adult goats in Sichuan Province, China. **PLoS One**, v.13, p.6, 2018.

ZLOBL, T. L. Amebiasis. **Primary Care Update for OB/GYNS**, v.8, n.2, p. 65-68, 2001.

ZOU, Y.; HOU, J. L.; LI, F. C.; ZOU, F. C.; LIN, R. Q.; MA, J. G.; ZHANG, X. X.; ZHU, X. Q. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in southern China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 52-56, 2018.